

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITA' DI BOLOGNA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE AGROAMBIENTALI

DOTTORATO DI RICERCA IN ENTOMOLOGIA AGRARIA - XX° CICLO

Settore Scientifico Disciplinare

AGR/11 - ENTOMOLOGIA GENERALE E APPLICATA

" SVILUPPO DELLA LOTTA AUTOCIDA CONTRO *Aedes albopictus*
(SKUSE) (DIPTERA: CULICIDAE) "

Tesi di dottorato di FABRIZIO BALESTRINO

Coordinatore
Prof. Piero Baronio

Relatore
Prof. Stefano Maini

ESAME FINALE: ANNO 2008

*Quelli che s'innamoran di pratica senza scienza
son come 'l nocchier ch'entra in navilio senza timone o bussola,
che mai ha certezza dove si vada.*

Leonardo da Vinci

1. INTRODUZIONE

- 1.1 - *Sterilità indotta negli insetti*
- 1.2 - *Effetti delle radiazioni sugli insetti*
- 1.3 - *Il progetto di eradicazione di *Cochliomyia hominivorax**
- 1.4 - *La tecnica dell'insetto sterile contro le zanzare*
- 1.5 - *Tecnica dell'insetto sterile in altri insetti*
- 1.6 - *Chemiosterilizzanti*
- 1.7 - *Dosaggio delle radiazioni*
- 1.8 - *Il ruolo dei meccanismi di regolazione delle popolazioni densità dipendenti*
- 1.9 - *Il ruolo dell'isolamento geografico della popolazione trattata*
- 1.10 - *La tecnica del maschio sterile contro *Aedes albopictus**

2. MATERIALI E METODI

- 2.1 - *Ambiente di prova e popolazione impiegata*

2.2 - Prove di Allevamento

- 2.2.1 - *Prova dieta*
- 2.2.2 - *Prova ATP*

2.3 - Prove di Sterilizzazione

- 2.3.1 - *Prove di irraggiamento 78 – 80 – 85 Gy*
- 2.3.2 - *Prove di irraggiamento 40 – 60 – 80 Gy su pupe maschio di età 16-24h, 24-40h e 40-48h*
- 2.3.3 - *Prova di irraggiamento a 20, 30, 40 e 50 Gy su pupe maschio di età 16-30h e 30-40h*

2.4 - Prove di Competizione

- 2.4.1 - *Prove preliminare in tunnel 2006 (50 – 60 Gy)*
- 2.4.2 - *Analisi dell'efficacia di accoppiamento nei maschi irraggiati*
- 2.4.3 - *Analisi della precocità di sfarfallamento nei maschi irraggiati*
- 2.4.4 - *Analisi dei tempi di rotazione dei genitali esterni nei maschi irraggiati*
- 2.4.5 - *Analisi della recettività all'accoppiamento delle femmine*
- 2.4.6 - *Prove in tunnel 2007 (40 Gy)*

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 - Prove di Allevamento

- 3.1.1 - *Prova dieta*
- 3.1.2 - *Prova ATP*

3.2 - Prove di Sterilizzazione

3.2.1 - Prove di irraggiamento 78 - 80 - 85 Gy

3.2.2 - Prove di irraggiamento 40 - 60 - 80 Gy su pupe maschio di età 16-24h, 24-40h e 40-48h

Analisi della fertilità

Analisi sopravvivenza

3.2.3 - Prova di irraggiamento a 20, 30, 40 e 50 Gy su pupe maschio di età 16-30h e 30-40h

Analisi di fecondità

Analisi della sopravvivenza (16-30h)

Analisi sopravvivenza (16-30h vs. 30-40h)

Analisi della fertilità

3.3 - Prove di Competizione

3.3.1 - Prova preliminare in tunnel 2006 (50 - 60 Gy)

3.3.2 - Analisi dell'efficacia di accoppiamento nei maschi irraggiati

3.3.3 - Analisi della precocità di sfarfallamento nei maschi irraggiati

3.3.4 - Analisi dei tempi di rotazione dei genitali esterni nei maschi irraggiati

3.3.5 - Analisi della recettività sessuale delle femmine

3.3.6 - Prove in tunnel 2007 (40 Gy)

Confronto tra tunnel testimone (A_A) e tunnel competizione (AA_A)

Confronto tra tunnel testimone (A_A) e i tunnel competizione Ibrido vs. Allevamento

Analisi fertilità residua e indici di competizione

4. CONSIDERAZIONI FINALI

5. BIBLIOGRAFIA

1. INTRODUZIONE

1.1 - Sterilità indotta negli insetti

Le scoperte realizzate in molte discipline scientifiche come la “radiobiologia”, la chimica, l'etologia animale, la biologia molecolare, la genetica e l'entomologia, hanno contribuito alle nostre attuali conoscenze circa il controllo degli insetti nocivi.

Nel 1895 W.K. Röntgen osservava e riportava nei suoi studi la scoperta dei raggi X. Nel 1903 gli effetti di questi raggi derivanti dal radium (radio) sul sistema riproduttivo e sullo sviluppo degli insetti erano investigati da C. Bohn e G.A. Runner e nel 1916 gli stessi autori trovarono che, basse dosi di raggi X diminuivano la capacità riproduttiva di *Lasioderma serricornes* (Coleoptera: Anobiidae), mentre dosi più elevate ne causavano la morte.

Nel 1926 H.J. Muller dimostrava che le radiazioni prodotte dai raggi X causavano cambiamenti ereditabili nel moscerino della frutta (*Drosophila melanogaster* Meigen) e che le mutazioni indotte con l'irraggiamento erano frequentemente mutazioni dominanti e letali.

In relazione al problema del controllo degli insetti, E. F. Knipling nel 1937 concepiva un nuovo approccio nel quale il naturale processo riproduttivo della mosca del bestiame (*Cochliomyia hominivorax* Coquerel) poteva venire distrutto attraverso meccanismi fisici o chimici al fine di rendere gli insetti sterili (Knipling, 1985). Questi insetti una volta sterilizzati possono essere rilasciati nell'ambiente in grande numero (da 10 a 100 volte il numero di insetti nativi) affinché possano accoppiarsi con quelli fertili presenti nell'ambiente.

L'accoppiamento tra un individuo fertile e uno sterile porta alla produzione e deposizione del carico ovarico che però non è in grado di evolvere e schiudere. Fino a quando il rapporto tra insetti fertili e sterili si mantiene tra 1:10 e 1:100, la maggior parte degli incroci risulta sterile. L'applicazione di tale strategia di lotta porta, con l'andare del tempo a una drastica riduzione del numero degli insetti nativi e ad una concomitante crescita della quota di individui sterili fino all'estinzione della popolazione nativa.

Questo metodo di controllo per gli insetti è oggi noto con il nome di “sterile insect technique” (SIT), o “sterile insect release method” (SIRM). L'utilizzo di radiazioni ionizzanti come sorgenti sterilizzanti sugli insetti si è dimostrata una tecnica estremamente efficace nel controllo di *Cochliomyia hominivorax*. Il successo del “screwworm SIT program” stimolò ulteriori studi volti all'analisi degli effetti delle radiazioni sulle prestazioni riproduttive di molti altri insetti di importanza economica e sanitaria.

L'impiego di mutageni chimici per la sterilizzazione di insetti in programmi di lotta con il metodo dell'autocidio venne inoltre considerato in funzione della loro efficacia d'azione (Knipling, 1979).

Prodotti chemiosterilizzanti potrebbero ad esempio essere aggiunti alla dieta di allevamento, o applicati direttamente su uova o pupe nel corso del normale processo di allevamento. Comunque l'impiego di tali prodotti è al momento molto limitato a causa di paure nei confronti di possibili contaminazioni ambientali prodotte dagli insetti trattati chimicamente con prodotti cancerogeni. Vi sono inoltre problemi per lo smaltimento delle diete arricchite di chemiosterilizzanti e per la sicurezza degli operatori che debbano svolgere mansioni a contatto con tali sostanze. Certi tipi di tinte foto-chimiche (es. D&C red number 28) hanno mostrato proprietà insetticide pur essendo ambientalmente sicure. La sfida che si presenta agli scienziati in questo ambito è la scoperta di nuovi agenti chimici da impiegare in sicurezza come agenti sterilizzanti per insetti.

Le principali componenti da realizzare per un efficace impiego dei principi di sterilità (Bartlett 1990) non sono cambiate significativamente dall'originale formulazione di E. F. Knipling e riguardano:

1. Tecniche di allevamento massale per la produzione un ampio numero di insetti sterili
(Rearing component)
2. Tecniche di sterilizzazione per un ampio numero di insetti target
(Treatment component)
3. Competitività degli insetti da rilasciare a seguito della sterilizzazione
(Competitiveness component)
4. Sistemi per il rilascio e la distribuzione degli insetti sull'area di trattamento
(Release component)
5. Strumenti per determinare la popolazione selvatica prima e dopo il rilascio degli insetti trattati
(Evaluation component)
6. Area di trattamento sufficientemente ampia o ben isolata tale da escludere la possibilità di immigrazione di femmine inseminate nell'area di rilascio
(Re-infestation component)

1.2 - Effetti delle radiazioni sugli insetti

L'energia contenuta nelle radiazioni aumenta al diminuire della lunghezza d'onda; con l'aumentare dell'energia le radiazioni si fanno più penetranti e nel contatto con gli atomi possono risultare ionizzanti determinando il rilascio di elettroni. Tra le radiazioni ionizzanti troviamo i raggi X, i protoni, i neutroni, i raggi alfa, beta e gamma.

Le unità di misurazione delle radiazioni che si incontrano in letteratura sono varie per cui può risultare utile ricordare le equivalenze tra le unità più usate in passato e la corrente unità di misura nel Sistema Internazionale:

1 Roentgen equivalent physical (Rep)	= ~1 Roentgen
1 Roentgen (R oppure r)	= $97,310 \times 10^{-4}$ Gy (in acqua)
1 Radiation absorbed dose (Rad)	= 0,01 Gy

Un R (o r) è la quantità di radiazione ionizzante in grado di produrre una carica elettrostatica unitaria in un cmq di aria. Cambiando il mezzo varia l'energia necessaria a determinare una stessa unità di carica.

Il numero di mutazioni indotte dipende largamente dalla dose di radiazione ionizzante assorbita con una relazione prossima alla proporzione lineare. Vi è invece scarsa relazione tra numero di mutazioni indotte e l'intensità con cui viene somministrata la radiazione (rateo).

A titolo d'esempio una singola rottura di cromosoma richiede 15-20 ioni, una singola mutazione letale può essere indotta da una sola ionizzazione.

E' noto che gli insetti sono relativamente poco sensibili alle radiazioni, e comunque in genere meno sensibili dei vertebrati (Fig.1.1).

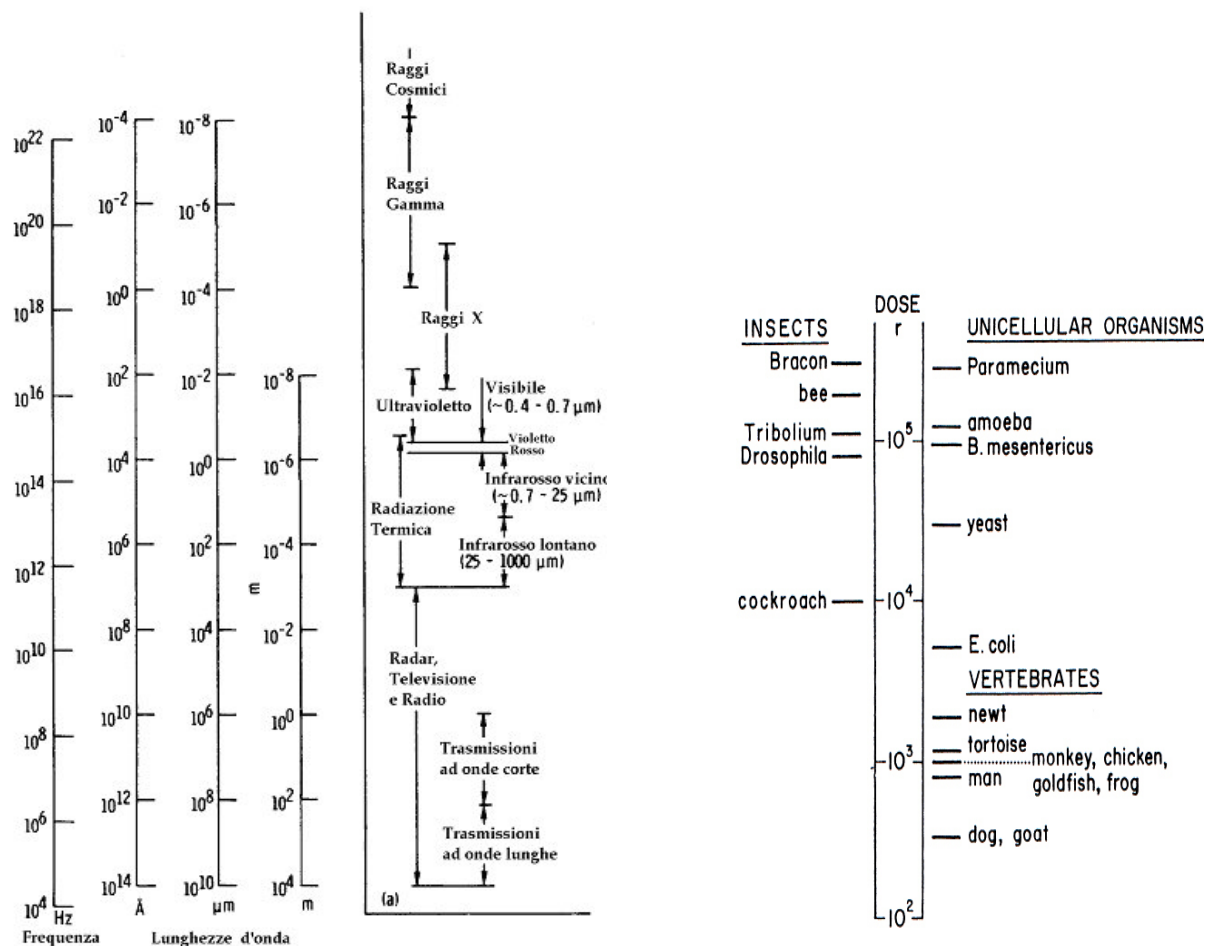


Fig.1.1 - Spettro delle onde elettromagnetiche (SX) e LD_{50} (scala log in R) per adulti di vertebrati, insetti e organismi unicellulari (da O'Brien e Wolfe, 1964)(DX)

Per una determinata specie di insetto la sensibilità alle radiazioni diminuisce in genere con l'avanzare dell'età da embrione ad adulto. Inoltre, nello stesso stadio, la sensibilità diminuisce con l'invecchiamento. Le ragioni della minor sensibilità alle radiazioni degli insetti rispetto ai vertebrati vanno ricercate nei due seguenti ordini di fattori.

- Secondo la legge di Bergonie-Tribondeau la sensibilità delle cellule alle radiazioni è proporzionale alla loro attività mitotica e inversamente proporzionale al loro grado di differenziazione;
- Negli insetti si trova una intensa moltiplicazione cellulare durante sviluppo embrionale, mentre dopo la schiusura dell'uovo il numero delle cellule rimane abbastanza stabile (tranne che in alcune fasi specifiche come prima della muta e alla fine della fase di impupamento).

Le cellule delle gonadi sono in continua moltiplicazione e questo spiega il perché, generalmente, la dose di radiazioni in grado di indurre sterilità in una specie è molto più bassa della dose letale. I primi stadi della spermatogenesi sono in genere più sensibili degli stadi avanzati (cioè gli spermatociti sono più sensibili degli spermatozoi).

Si consideri che per la maggior parte dei casi (esclusi i lepidotteri che risultano meno sensibili) la dose di radiazioni necessaria ad ottenere la sterilità nei maschi è nell'ambito 20-150 Gy, mentre effetti evidenti in termini di mortalità dei maschi trattati sono visibili a dosaggi 5-10 volte superiori (Cole *et al.*, 1959; Darrow, 1968). All'interno della specie (*Culex tarsalis*) la sensibilità risulta decrescente con l'avanzare dello sviluppo uova-larve-adulti (Darrow, 1968). Un prospetto indicativo sul livello di sensibilità di alcune famiglie di insetti, acari e aracnidi è riportato in figura 1.2.

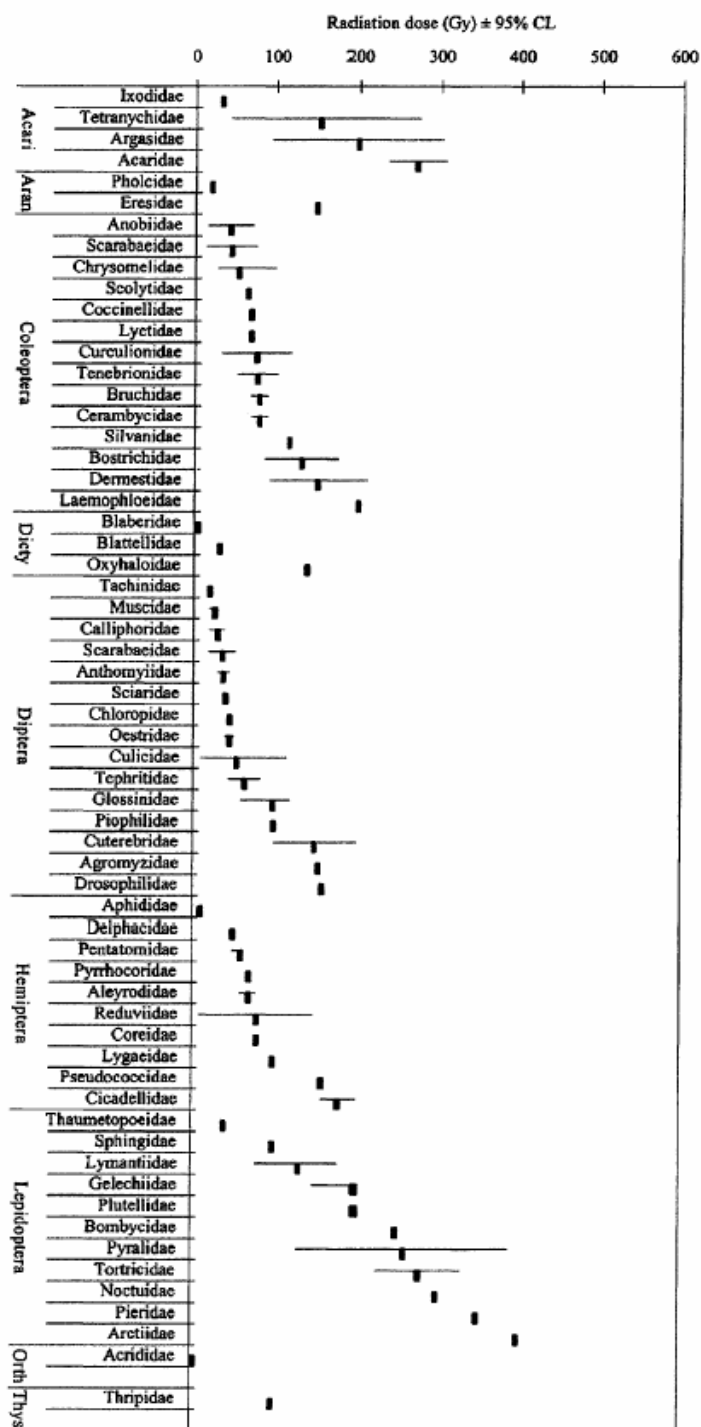


Fig.1.2 - Dosi di radiazioni di riferimento per la sterilizzazione dei maschi in alcune famiglie di insetti, acari e aracnidi (Mean \pm 95% LC) (da Bakri *et al.*, 2005)

Le femmine risultano in genere più sensibili dei maschi conspecifici. Questo perché il maschio può sopravvivere meglio nonostante la rottura dei cromosomi. A questo fenomeno si deve ascrivere la sterilità della progenie che si osserva a seguito dell'irraggiamento parentale con sopravvivenza selettiva degli individui maschili che risultano largamente sterili (Bakri *et al.*, 2005).

La sterilità indotta dalle radiazioni si verifica a seguito dei danni cromosomici a livello delle cellule germinali. Le radiazioni inducono mutazioni letali dominanti, traslocazioni e altre aberrazioni cromosomiche con rottura del cromosoma che portano alla formazione di gameti sbilanciati con successiva morte dell'embrione. Fortunatamente le mutazioni non bloccano lo sviluppo dell'oocita o dello spermatozoo né ne impediscono la partecipazione alla formazione dello zigote. Solitamente quello che si verifica è la morte dell'embrione nella fase delle prime divisioni cellulari. Conseguentemente l'uovo viene fertilizzato ma non schiude. Vi è in generale un buon margine di separazione tra la dose sterilizzante e la dose letale (Cole *et al.*, 1959).

Risulta che sia stato Knippling (1955) il primo a pensare possibile la lotta genetica agli insetti parlandone ai suoi collaboratori nel 1938 (Smith *et al.*, 1964). Ma tra i pionieri possiamo citare anche Serebrovskii, Potts e Vanderplank (LaChance e Knippling, 1962; Pal e LaChance, 1974).

Si ritiene comunemente che la monogamia delle femmine sia un requisito biologico importante perché la tecnica SIT possa avere successo nei confronti di una specie. Ciò non è corretto in quanto anche nel caso di inseminazione multipla la fecondità della femmina dipenderà sempre dal rapporto tra maschi sterili e maschi fertili presenti nell'ambiente, rimanendo invece importante il grado di competitività dei maschi sterili nei confronti dei maschi fertili e degli spermatozoi sterili contro quelli fertili. E' infatti da sottolineare d'altro canto che riguardo al problema dell'immigrazione nel caso di monogamia le femmine già fecondate non potranno in alcun modo risentire della presenza di maschi sterili nell'ambiente cosa non vera nel caso di poligamia femminile (Curtis, 1985).

1.3 - Il progetto di eradicazione di *Cochliomyia hominivorax*

Knippling suggerì per primo l'idea che *C.hominivorax* potesse essere eradicata dal sud degli Stati Uniti con la tecnica del maschio sterile. Bushland e Hopkins (1953) trovarono che i maschi di *C.hominivorax* erano molto sensibili alle radiazioni essendo possibile renderli sterili con 25 Gy, mentre le femmine richiedevano una dose più alta (65 Gy). Le pupe di 5-6 giorni di età risultavano sensibili a dosaggi simili, per cui diventava vantaggioso maneggiarle.

E' del 1954 il primo successo nell'applicazione della tecnica SIT contro *C.hominivorax* a Curacao, un'isola di 500 kmq al largo del Venezuela (Baumhover *et al.*, 1955), in Florida nel 1959 e a seguire in tutto il sud degli USA e negli stati del Centro America (Whitten e Foster, 1975; Wyss, 2000)(Fig.1.3). Appositi accordi sono stati sottoscritti tra USDA e i vari governi nazionali che intendevano usufruire dell'appoggio statunitense sulla base di una compartecipazione 80-20 % rispettivamente. Questo investimento era considerato vantaggioso anche per gli Stati Uniti in quanto in grado di allargare la fascia di protezione libera dalla mosca al sud del paese riducendo in questo modo il rischio di reinvasioni. Nella fase iniziale la tecnica di sterilizzazione era basata sui raggi X, poi si passò al Co60 (dosaggi compresi

tra 5.000 e 7.500 R) ed infine al Cesio 137. Varie prove dimostrarono una sostanziale equivalenza tra raggi X e raggi gamma (Bushland e Hopkins, 1953).

Si calcola che il programma consenta un vantaggio agli allevatori che supera il miliardo di dollari annuo (<http://www.aphis.usda.gov/bad/refbook2000/Screwworm>).

Nel 1988 si registrò l'introduzione accidentale della specie in Libia, dove in pochi mesi il numero di casi riportati mostrò la tipica curva a iperbole. Il gruppo di lavoro congiunto FAO/IAEA fu in grado di sviluppare un efficace programma di eradicazione basato sul materiale allevato in Mexico. I primi lanci sono del dicembre 1990 raggiungendo in seguito un picco di 40 milioni/settimana di mosche lanciate. Nel luglio 1991 la Libia fu dichiarata libera dalla specie.

Risulta sia tuttora in corso il progetto di eradicazione della specie da tutto il Centroamerica (<http://www.fao.org/ag/Aga/AGAP/FRG/FEEDback/War/u4220b/u4220b0j.htm>).

Il primo impianto massale si trovava in Texas, mentre dal 1976 divenne operativo l'impianto di Tuxtla in Messico con una capacità produttiva dell'ordine di 40-100 milioni di mosche alla settimana (Wyss, 2000). Essendo dal 1991 il Messico liberato della mosca vi è il rischio di fughe accidentali dall'allevamento il che fa considerare con favore la dislocazione dell'impianto in un'area infestata.

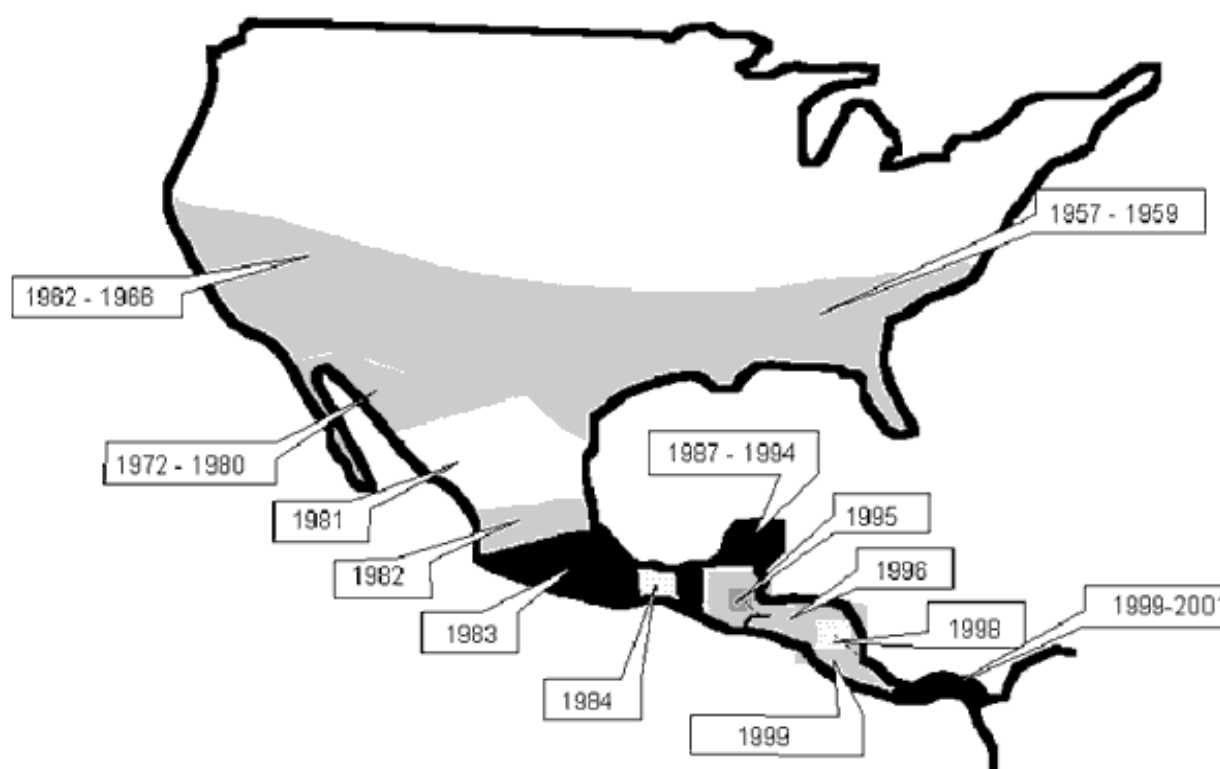


Fig.1.3 - Progressione delle aree di eradicazione di *C.hominivorax* in America

(da <http://www.fao.org/DOCREP/004/Y2022E/y2022e02.htm>)

1.4 - La tecnica dell'insetto sterile contro le zanzare

I risultati dell'applicazione della tecnica dell'insetto sterile su Culicidi sono stati ampiamente variabili e accanto ad alcuni iniziali successi riferibili perlopiù ad aree isolate (Patterson *et al.*, 1970; Lofgren *et al.*, 1973) si annoverano diversi insuccessi (Weidhaas *et al.*, 1962). Negli anni 1959-'62 fu condotta un'esperienza nei confronti di *Anopheles quadrimaculatus* in Florida (Weidhaas *et al.*, 1962; Dame *et al.*, 1964) che fornì scarsi risultati. Ricerche successive mirate ad indagare le cause, supportarono l'ipotesi che i maschi sterili avessero difficoltà nella dispersione e nel contatto con le femmine vergini selvatiche, difficoltà attribuibile più alla selezione del ceppo colonizzato che all'effetto depressivo delle radiazioni o della chemiosterilizzazione. In effetti *An. quadrimaculatus* è specie di difficile colonizzazione in quanto riluttante ad accoppiarsi in gabbia (Dame *et al.*, 1964).

Nel progetto condotto negli anni '70 in El Salvador su *An. albimanus*, vettore primario di malaria, si giunse a costruire un impianto in grado di produrre 1 milione di maschi /giorno, chemiosterilizzati allo stadio pupale con bisazir. Nelle fasi iniziali si organizzò il lancio degli adulti per poi passare al lancio delle pupe, più semplice ed efficiente (Bailey *et al.*, 1979; Lowe *et al.*, 1980). Nell'esperimento pilota condotto nel 1972 da Lofgren *et al.* (1974), lanciando complessivamente 4,3 milioni di maschi sterili (con una presenza indesiderata di femmine stimata del 14%), in una zona sul Lago Apastepeque, nell'arco di 5 mesi, si indusse una sterilità del 99 %.

L'unità di produzione aveva una superficie di 40 mq di cui 10 mq impegnati dalle vaschette delle larve e dalle gabbie degli adulti (Dame *et al.*, 1974). Si produsse anche un ceppo mutante con maschi resistenti al propoxur denominato MACHO. Questa linea in prove di campo con materiale semi-selvatico forniva prova di buon livello di competitività (Kaiser *et al.*, 1979).

Il progetto storicamente più importante è forse quello mirato a *Cx.p. quinquefasciatus* e successivamente ad *Ae. aegypti* e *An. stephensi*, finanziato da WHO e USPHS (United States Public Health Service) in collaborazione con ICMR (Indian Council of Medical Research). L'unità fu fondata nel 1969 sulla base di un budget di 2 milioni di \$ per un periodo di 6 anni (Pal e LaChance, 1974). L'impianto massale di New Delhi arrivò a produrre un milione di individui al giorno al costo di 40 \$. La separazione dei sessi era condotta sulle pupe per mezzo di setacci con una presenza inquinante di femmine ritenuta accettabile dello 0,6 % (Sharma *et al.*, 1972). La sterilizzazione era ottenuta mediante trattamento delle pupe in acqua con tiotepa. Alla dose idonea al raggiungimento del 99% di sterilità nei maschi le femmine mantenevano un buon grado di fertilità, ma ciò era considerato accettabile in considerazione del fatto che le femmine con residuo di fertilità avevano alte probabilità di accoppiarsi coi maschi sterili co-lanciati. Si provarono anche ceppi sterili per doppia traslocazione (Grover *et al.*, 1976). Il progetto fu chiuso a furor di popolo nel 1975 sommerso da critiche e speculazioni di natura socio-politica (Anonymous, 1975). Ancora su *Ae. aegypti* è da ricordare il tentativo condotto in Kenya negli anni '70 lanciando in campo un ceppo omozigote sterile per traslocazione. Si poté stabilire che la fitness in campo del ceppo era deficiente in termini di fertilità, tempo di sviluppo larvale, sopravvivenza delle larve e degli adulti e nella fase di accoppiamento rispetto alla popolazione naturale; di conseguenza il materiale genetico introdotto fu velocemente spiazzato (Lorimer *et al.*, 1976).

Nel sud della California, negli anni 1977-1983, fu condotto uno studio applicativo su *Cx. tarsalis*, che portò importanti contributi conoscitivi nel settore. Fu ad esempio possibile verificare che le radiazioni utili ad ottenere sterilizzazione dei maschi avevano scarsi effetti negativi sulle loro capacità di accoppiamento

in gabbia con femmine selvatiche (Zalom *et al.*, 1981), mentre il peso negativo della colonizzazione appariva determinante (Reisen *et al.*, 1980; Reisen *et al.*, 1982). In effetti irraggiando i maschi, raccolti come pupe in natura, con raggi gamma alla dose di 60 Gy si induceva una sterilità nella popolazione selvatica pari a quella attesa sulla base di un coefficiente di competizione di 1 : 1 (Reisen *et al.*, 1981). Utilizzando invece materiale in allevamento da 9-16 generazioni la sterilità indotta nella popolazione selvatica era più bassa indicando una competitività dei maschi sterili del 29 % (Reisen *et al.*, 1982). Entrando nel merito dei motivi in grado di incidere negativamente sul comportamento dei maschi in campo Reisen *et al.* (1985) osservarono che la colonizzazione selezionava ceppi meglio adattati a formare sciami di accoppiamento e ad accoppiarsi in gabbia ma che avevano ridotte capacità di formare sciami di accoppiamento in natura rispetto ai maschi selvatici. E' interessante il fatto che invece i maschi selvatici di *Cx.tarsalis* si accoppiavano male nelle gabbie anche se di dimensioni considerevoli (6x10x5 m) subendo un effetto disturbante dalla presenza delle pareti. Gli autori ipotizzavano la compresenza nella popolazione selvatica di sub-popolazioni separate con comportamento specifico nella fase di accoppiamento e di scelta dei luoghi e tempi di formazione degli sciami. La colonizzazione inevitabilmente andava a selezionare la sub-popolazione meglio adattabile al volo di accoppiamento in ambiente ristretto.

Furono anche ottenuti ceppi mutanti in grado di buona competitività in prove in gabbie all'aperto (Terwedow *et al.*, 1977). Questo progetto rimase però a livello pilota non essendo stata intrapresa la via dello sviluppo di un allevamento massale.

Nella sperimentazione relativa a *Cx.tritaeniorhynchus* in Pakistan, utilizzando un ceppo sessato per via genetica (*ts*/), si poté stabilire che i maschi sterili erano altamente competitivi per l'accoppiamento con femmine allevate in laboratorio e lanciate in campo, ma non competitivi con le femmine selvatiche. Questo fenomeno fu successivamente confermato con una sperimentazione ad hoc utilizzando un altro ceppo mutante (*In(3)T(2,3)I*) (Reisen *et al.*, 1980). Da queste evidenze gli autori deducevano che l'allevamento selezionava un ceppo meglio adattato all'ambiente artificiale ma non più in sintonia con le femmine selvatiche (Baker *et al.*, 1979).

Recentemente si assiste a un tentativo di rilancio della tecnica del maschio sterile nella lotta contro *An. stephensi*, vettore primario di malaria nelle zone urbane dell'India (Jayaraman, 1997; Rai, 1997). Tentativo che ha l'ambizione di partire dall'analisi critica dell'insuccesso del famoso progetto già citato (Anonymous, 1975).

1.5 - Tecnica dell'insetto sterile in altri insetti

Tra le esperienze storiche di maggior rilievo citiamo il progetto SIT contro *Laspeyresia (Cydia) pomonella* nella Columbia Britannica operativo nel periodo 1962-72 su un'area frutticola di circa 11.000 ettari (Whitten e Foster, 1975). La sterilizzazione era condotta con raggi gamma e i lanci mediante aereo. La dose di lancio stimata come idonea a contenere la popolazione entro livelli non dannosi era di 40 : 1 (sterili : fertili). Fu possibile appurare la convenienza nel ridurre i dosaggi di raggi gamma entro valori di 25-30 krad in modo da ottenere maschi sessualmente più competitivi anche se non completamente sterili; infatti le larve F₁ derivanti da questi maschi erano inette a sopravvivere in campo (Whitten e Foster, 1975). Il progetto venne dismesso perché più costoso nel breve periodo rispetto alla lotta

chimica, non essendo accettata e condivisa l'idea di investire per alcuni anni con l'obiettivo di eradicare il lepidottero. Nella California meridionale è attivo dal 1994 un programma SIT finalizzato a prevenire la diffusione di *Ceratitis capitata* attraverso il lancio massale giornaliero continuato di individui sterili (Barry *et al.*, 2004). L'area interessata è di oltre 6.000 kmq, il costo annuo del progetto di 18,6 milioni di \$ a fronte di un danno per il settore agricolo stimabile in 1,3-1,9 miliardi di \$ nel caso di colonizzazione permanente della mosca.

Analogo programma di prevenzione risulta tuttora attivo in Florida dopo l'eradicazione della specie avvenuta nel 1998. Vengono lanciate per via aerea 100 milioni di pupe/settimana con un budget complessivo di 3,4 milioni di \$ (rif. 2002)(<http://www.doacs.state.fl.us/pi/methods/images/sirfboohlet.pdf>).

Su *C. capitata* è stato possibile individuare che l'esposizione dei maschi sterili all' α -copaene, un sesquiterpene presente nell'olio di radici di zenzero (*Zingiber officinale* Roscoe), aumenta la loro capacità di accoppiamento con le femmine (Flath *et al.*, 1994).

Sembrano inoltre presenti delle popolazioni caratterizzate da esigenze specifiche in fase di accoppiamento, il che richiederebbe l'impiego di ceppi della stessa origine geografica delle popolazioni da sopprimere (Shelly *et al.*, 2003).

Gli impianti massali di *C. capitata* nel mondo attualmente operativi sono a El Pino (Guatemala) dove si alleva il ceppo VIENNA 7/Tol-99, con una capacità produttiva fino a 2 miliardi di maschi / settimana e un costo di mercato di circa 275 \$ / milione di pupae; Mendoza (Argentina) dove si alleva un ceppo *tsl* con una capacità fino a 100 milioni di maschi / settimana; Madeira dove si alleva un ceppo *tsl* (VIENNA 7/Mix-2000); Australia dove si alleva un ceppo *tsl* (VIENNA 7/Mix 99) con una capacità fino a 5 milioni di maschi / settimana; Sud Africa dove si alleva VIENNA 7/Mix 99 con una capacità produttiva fino a 6 milioni di maschi / settimana. Sono inoltre attivi altri grossi impianti nelle Hawaii che forniscono il materiale per il programma di prevenzione in corso in California e in Messico. Tutti i più importanti allevamenti SIT di *C. capitata* impiegano attualmente ceppi *tsl* che hanno permesso di eliminare le femmine nella fase iniziale dell'allevamento e cosa molto importante di eliminare il danno che le femmine sterili causavano ai frutti con l'inserzione dell'ovopositore (Hendrichs *et al.*, 1995; Robinson, 2002).

La mosca delle cucurbitacee *Bactrocera cucurbitae* che aveva invaso le isole sudoccidentali del Giappone nel periodo 1919-1974, causando ingenti danni all'agricoltura, è stata eradicata con un programma SIT attivo nel periodo 1972-1993 (Koyama *et al.*, 2004).

Di grande interesse appare la possibilità di applicazione della tecnica SIT sul complesso delle mosche tsetse, che in linea teorica e anche dalle prove condotte ben si prestano alla metodica (<http://www.fao.org/DOCREP/004/Y2022E/y2022e02.htm>).

Un progetto pilota condotto nell'isola di Zanzibar dall'IAEA mediante impiego di raggi gamma e lancio aereo dei maschi sterili due volte la settimana nel periodo 1994-'97 ottenne l'eradicazione di *G.austeni* (Vreysen *et al.*, 2000). Un lepidottero Tortricide, *Cryptophlebia leucotreta*, è recentemente al centro dell'attenzione per il possibile controllo nell'area di origine (Sud Africa) e per l'adozione di sistemi di prevenzione con tecnica SIT negli Stati Uniti (Bloem *et al.*, 2003). In questo caso le femmine risultano più sensibili dei maschi ai raggi gamma superando in questo modo la necessità della separazione dei sessi. Interessanti sono le evidenze emerse sugli effetti dilazionati delle radiazioni sulla progenie (Bloem *et al.*, 2003). Risulta che nel mondo siano attualmente attivi circa 40 impianti massali SIT, una trentina dei quali inseriti nell'archivio IDIDAS. (<http://www-ididas.iaea.org/ididas>)

1.6 - Chemiosterilizzanti

Nel 1961 LaBrecque scoprì che alcuni derivati dell'aziridina (aphamide, Tepa e apholate) inducevano sterilità in mosca domestica. Si apriva così un nuovo capitolo: quello dei chemiosterilizzanti.

Dagli inizi degli anni '50 si era a conoscenza che sostanze in grado di influenzare la mitosi cellulare avevano interesse nella terapia antitumorale e in alcuni casi anche azione contraccettiva. Da queste informazioni partì un vasto programma USDA di screening sull'effetto sterilizzante negli insetti di composti già noti. In seguito furono anche sintetizzate nuove molecole sulla base dei gruppi funzionali più attivi (Smith *et al.*, 1964).

Tra i gruppi di sostanze più attive ricordiamo:

1. gli alchilanti che funzionano sostituendo negli acidi nucleici un atomo di idrogeno con un radicale alchilico. Ricordiamo i derivati della bis(-cloroetil)amina; gli analoghi dell'aziridina (N-propil-1 aziridin-carbossiamide; 1,4 bis(1-aziridinil-carbonil)piperazina; tepa; metepa; tiotepa; tetramina; afamide; afolato.
2. gli antimetaboliti in grado di interferire sul metabolismo degli acidi nucleici. Ricordiamo gli analoghi delle purine, delle pirimidine e dell'acido folico.
3. gli antimitotici che bloccano la divisione del nucleo. Ricordiamo la colchicina, l'aldrina, la cumarina, l'etilene-urea, la 2-tiourea.

Vari programmi di screening dell'effetto di nuove molecole sulla fertilità nelle zanzare sono stati condotti soprattutto negli Stati Uniti. Mulla (1964) testando Apholate, Tepa, Metepa su larve e adulti di *Cx. quinquefasciatus* otteneva buoni livelli di sterilizzazione nel caso di trattamento via orale degli adulti con migliori risultati a carico di Apholate. Patterson *et al.* (1971) in uno studio sulle possibilità metodologiche per sterilizzare grandi quantità di pupe di *Cx.p. quinquefasciatus* individuava come promettente l'impiego di tiotepa secondo la tecnica proposta da White (1966). Esponendo le pupe maschio alla dose dello 0,7% di tiotepa per 4 h essi rimanevano competitivi con i maschi normali.

Lofgren *et al.* (1973) studiarono l'effetto sterilizzante sulle pupe di *An. albimanus* di 19 composti derivati dell'aziridina riscontrando un discreto margine di sicurezza tra dose sterilizzante e dose tossica.

Apparve anche interessante il fatto che alcuni composti avessero insieme ad una ottima efficacia sterilizzante la proprietà di causare minori danni rispetto alle radiazioni nei maschi trattati. Ad es. nel programma contro *An. albimanus* in El Salvador si osservò che *P,P-bis(1-aziridinil)-N-methyl phosphinothioic amide* non causava evidenti effetti negativi sui maschi trattati lasciandone pressoché inalterata la longevità e la capacità di dispersione in campo (Dame *et al.*, 1974; Lowe *et al.*, 1975).

Nel nostro Paese ci fu un periodo di attenzione da parte dei ricercatori più attenti (Celli, 1968) ed intenso lavoro sperimentale soprattutto nei confronti di *Musca domestica* con risultati di assoluta rilevanza (Saccà e Stella, 1964; Saccà *et al.*, 1965; Saccà *et al.*, 1967; Saccà *et al.*, 1969; Saccà *et al.*, 1972; Saccà *et al.*, 1975). Purtroppo fu pure evidente che questi composti essendo altamente reattivi avevano pesanti effetti genotossici anche sui vertebrati e risultavano perciò di assai difficile impiego. Sono di fatto spariti dalla scena della ricerca.

1.7 - Dosaggio delle radiazioni

Molti sono gli studi che hanno dimostrato l'efficacia delle radiazioni nell'induzione di sterilità negli insetti. La sensibilità alle radiazioni risulta variabile a seconda della specie e all'interno della stessa specie a seconda della provenienza geografica. Per la stessa specie la sensibilità varia con lo stadio trattato e all'interno dello stadio con l'età.

Nel programma di sterilizzazione condotto negli anni '60 contro *An. quadrimaculatus* in Florida si irraggiavano pupe di età 0-24 h con 12.000 r (116 Gy) di raggi gamma da Co60 con rateo di 660 r/min (Dame *et al.*, 1964). Inizialmente erano stati Davis *et al.* (1959) a mostrare che dosaggi di 8.865 – 12.900 roentgens (pari a 86-125 Gy) di raggi gamma, applicati alle pupe o agli adulti inducevano sterilità in entrambi i sessi.

Sempre con raggi gamma da Co60 su *Cx.tarsalis* in Oregon, Darrow (1968) ottenne femmine 100% sterili a 50 Gy e 94% sterili a 40 Gy quando trattate come pupe; mentre i maschi risultavano meno sensibili richiedendo dosaggi circa doppi.

Smittle *et al.* (1971a) testarono l'effetto dei raggi gamma su *Cx.p.quinquefasciatus* osservando che: le uova erano lo stadio più sensibile alle radiazioni determinandosi schiusura ridotta e mortalità totale durante lo sviluppo larvale già con 15 Gy; le larve accusavano elevata mortalità, anche se non immediata, già a 40 Gy; le pupe e gli adulti non mostravano mortalità a dosaggi di 100 Gy che determinavano un livello di sterilità del 99 %; le pupe e gli adulti anche quando trattati rispettivamente con 120 e 200 Gy mantenevano un piccolo residuo di fertilità; la sensibilità alle radiazioni era simile tra pupe di età < 24 h e adulti di età < 10 h.

Lo stesso gruppo (Smittle *et al.*, 1970) mise a confronto l'efficacia dei raggi gamma e dei raggi X nell'induzione di sterilità nei maschi della stessa specie trattati allo stadio di adulti. La sensibilità risultò simile con leggera superiorità per i raggi X che alla dose di 80 Gy (ratio di 4 Gy/min) inducevano il 98,44 % di sterilità mentre i raggi gamma alla stessa dose (ratio 3,7-4,1 Gy/min) inducevano il 95,29 %.

Smittle *et al.* (1971b) compararono anche gli effetti dei raggi gamma con quelli prodotti da irraggiamento con neutroni veloci dotati di 6 MeV di energia. Il dosaggio necessario per indurre il 99 % di sterilità nelle pupe maschio di *Cx.p.quinquefasciatus* (pupe di età < 24 h) risultò di circa 20 Gy per i neutroni e di circa 75 Gy per i raggi gamma, evidenziandosi quindi una maggiore sensibilità ai neutroni. Cosa questo comportasse in termini di effetti sulle performances dei maschi irradiati non è dato sapere.

Patterson *et al.* (1975) trattando le pupe della stessa specie alla dose di 60 Gy ottennero l'induzione di sterilità attesa nella popolazione selvatica. Trattando gli adulti di età > 24 h invece delle pupe o dei maschi < 24 h non si rilevava perdita di vigore sessuale. E' importante rimarcare che le femmine esposte allo stesso dosaggio sia come pupe che come adulti risultavano completamente sterili.

Lavorando sulle pupe della stessa specie Wijeyaratne *et al.* (1977), utilizzando Co60 nel range 5-10 kr (ratio 1.224-1.258 r/min), ottennero sterilità crescente con il dosaggio nel range 56-98,5 %. Separando poi le pupe in due categorie: pupe giovani (4-8 ore di età) e pupe anziane (22-28 ore di età) osservarono maggiore sensibilità alle radiazioni nelle pupe anziane (Sterilizing Dose 90 pari a 9,3 kr per le pupe giovani e 8,9 kr per le pupe anziane). Inoltre la mortalità risultava più bassa per le pupe anziane rispetto alle giovani. Gli autori concludevano che risultava vantaggioso irraggiare pupe anziane rispetto alle giovani. Era tuttavia evidente in ogni caso che si aveva una perdita di competitività nei maschi irraggiati come pupe rispetto ai maschi normali, e che questa perdita si verificava già a dosi non in grado di

indurre sterilità completa. Conseguentemente proposero un semplice modello teorico per stimare la dose più conveniente a cui operare sulla base dei dati di laboratorio ottenuti.

Utilizzando raggi X su pupe di *An.albimanus* di età non superiore alle 24 ore Ali e Rozeboom (1972), con dosaggi nel range 20 – 80 Gy, osservarono che a tutti i dosaggi i maschi mantenevano la capacità di inseminare le femmine; non c'era incremento di mortalità a seguito dell'irraggiamento; la fecondità delle femmine irraggiate risultava fortemente ridotta già a dosaggi bassi ma con una fertilità simile alle femmine normali; mentre la produzione di uova delle femmine normali che si accoppiavano con maschi irraggiati rimaneva nella norma. Il 100 % di sterilità si raggiungeva con 80 Gy.

Abdel-Malek *et al.* (1967) lavorando su pupe di *An.pharoensis* con raggi gamma nel range 10.000-13.000 R (97 - 126 Gy) ottennero sterilità completa di maschi e femmine alla dose di 116 Gy con evidenti effetti negativi sugli adulti ottenuti. La somministrazione della dose in un'unica soluzione risultava preferibile alla somministrazione in dosi frazionate.

1.8 - Il ruolo dei meccanismi di regolazione delle popolazioni densità dipendenti

Il problema della definizione e conoscenza dei meccanismi di regolazione delle popolazioni dipendenti dalla densità risulta fondamentale nel campo della lotta agli insetti nocivi in generale e maggiormente nel campo della lotta genetica. Avendo l'obiettivo di eradicare una specie da un certo ambito territoriale è necessario attraversare tutto il percorso della progressiva riduzione della sua densità ed i conseguenti risvolti in termini di effetti sui fattori di regolazione naturali.

Purtroppo si tratta di un tema complesso e difficile da studiare in campo per cui le informazioni disponibili sono assai parziali e di carattere perlopiù orientativo.

In uno studio condotto da Weidhaas *et al.* (1971) in una piccola isola delle Florida Keys centrato su *Cx.p. quinquefasciatus* con immissione di maschi chemiosterilizzati si è potuto stabilire che il tasso di incremento della popolazione passava da valori compresi nel range 1-3,5 X a valori intorno a 10 X e che ciò era attribuibile alla sterilità indotta dai maschi lanciati e dalle ovature sottratte. Inoltre il valore 10 X appariva come un limite intrinseco insuperabile anche a seguito di ulteriore sterilità indotta.

In India fu possibile stabilire che la sopravvivenza da uovo ad adulto era di circa il 70% nel caso di una singola ovatura di *Cx.fatigans* per container, mentre scendeva all'1% nel caso di 125 ovature/container (citato in Pal e LaChance, 1974).

Rajagopalan *et al.* (1977) hanno messo in evidenza che per *Cx.p. fatigans* in ambiente urbano la sopravvivenza larvale è densità/dipendente e che quindi andando ad introdurre una quota di sterilità bassa si otterrebbe il risultato inverso, cioè di avere un incremento di produzione di adulti. La mortalità naturale nelle larve è inoltre variabile nel corso stagionale, potendosi individuare i periodi più favorevoli per l'applicazione di metodiche di controllo genetico.

In generale è da ritenere che la sterilità indotta in una popolazione risulta maggiore se si prendono in considerazione le uova rispetto agli adulti. La discrepanza tra i due indicatori è un dato ampiamente variabile da caso a caso (Asman *et al.* 1981).

1.9 - Il ruolo dell'isolamento geografico della popolazione trattata

Si tratta di un fattore di immediata evidenza e fondamentale rilevanza. Anche con bassi livelli di immigrazione di femmine fecondate nell'area di applicazione SIT l'eradicazione diventa obiettivo irraggiungibile.

Utilizzando il modello classico di Knipling, Asman *et al.* (1981) hanno stimato che basta un tasso di immigrazione del 3,5 % rispetto alla popolazione iniziale per annullare l'effetto di un programma SIT potenzialmente in grado di raggiungere l'eradicazione nell'arco di 3 generazioni (Fig.1.4)

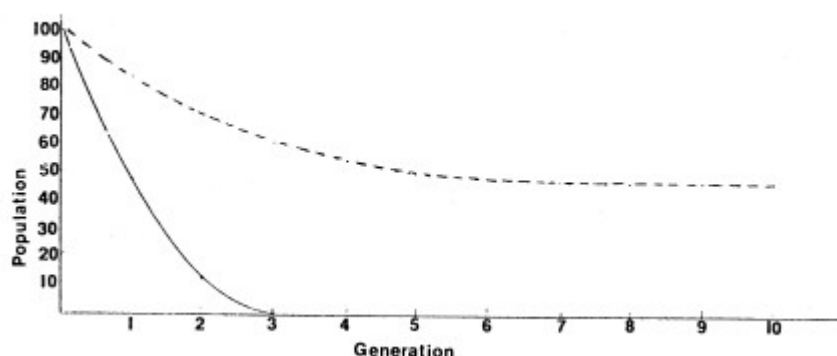


Fig.1.4 - Stima della dinamica di popolazione a seguito di applicazione SIT senza immigrazione (linea continua) e con immigrazione del 3,5 % (linea tratteggiata) (da Asman *et al.*, 1981)

1.10 - La tecnica del maschio sterile contro *Aedes albopictus*

Il numero degli individui sterili da rilasciare è funzione dell'entità della popolazione infestante essendo in genere necessario raggiungere rapporti tra numero di maschi sterili e numero di maschi fertili non inferiore a 9-10\1. Le esperienze da noi condotte in diverse aree infestate del Nord Italia dimostrano che i sistemi di lotta integrata adottati sono in grado di contenere le densità di popolazione della zanzara entro livelli estremamente ridotti contribuendo a ridurre notevolmente il numero di individui sterili da rilasciare (Celli *et al.*, 1994; Bellini *et al.*, 1994; Bellini *et al.*, 1995; Bellini *et al.*, 1996; Bellini *et al.*, 1997).

In generale dall'esperienza maturata nel settore si ritiene che i fattori determinanti sul grado di successo di un programma SIT possano essere così riassumibili (da Asman *et al.* 1981 modificato):

1. Possibilità di allevamento massale della specie
2. Sicurezza che il materiale lanciato non presenti rischi per l'ambiente e la salute
3. Le caratteristiche genetiche e biologiche della specie siano idonee
4. Il materiale allevato conservi nel tempo elevata qualità
5. Nel caso risulti necessario lanciare solo maschi sia disponibile un valido sistema di sessaggio
6. Esista un sistema di trasporto semplice dall'allevamento al campo

7. Il materiale lanciato sia competitivo nella fase di accoppiamento con la popolazione selvatica
8. La capacità produttiva dell'allevamento sia adeguata all'obiettivo
9. Il metodo e la periodicità di lancio del materiale in campo siano adeguati al suo comportamento di dispersione, sopravvivenza e accoppiamento e risultino praticabili
10. La popolazione selvatica sia di dimensioni contenute
11. I meccanismi di regolazione densità-dipendenti siano adeguatamente conosciuti
12. Il grado di immigrazione dall'esterno dell'area di lavoro sia sufficientemente basso
13. Il bilancio costo/beneficio sia favorevole nei confronti di altri metodi di lotta.

Generalmente si ritiene che sotto il profilo dell'analisi dell'efficienza del metodo di lotta contro una specie dannosa sia da considerare conveniente applicare metodi convenzionali (ad es. lotta chimica) quando la densità di popolazione sia elevata, riducendosi poi l'efficienza con la diminuzione della densità di popolazione. Il contrario dovrebbe succedere con la tecnica del maschio sterile, che indubbiamente si avvantaggia, anche in termini di costi di gestione, nell'operare contro una popolazione di dimensioni ridotte. Uno schema esemplificativo dei rapporti di efficienza nell'integrazione tra i metodi di lotta convenzionale e genetica è fornito di seguito (Fig.1.5).

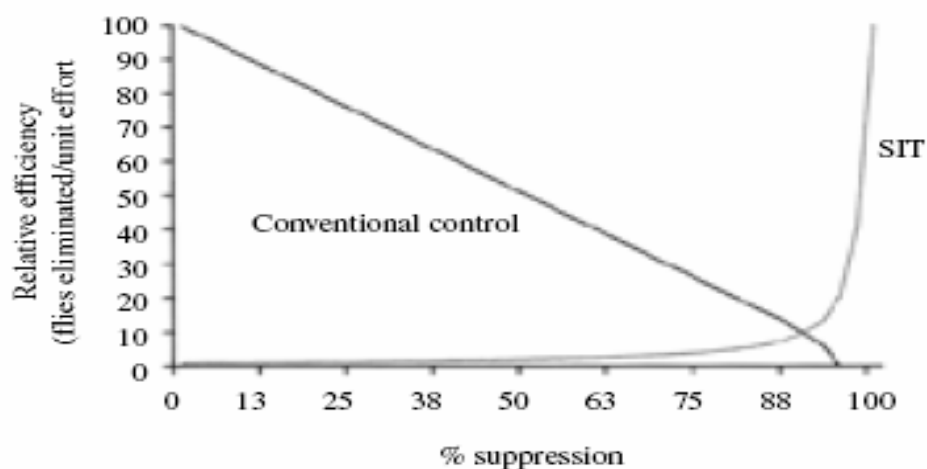


Fig.1.5 - Schema concettuale dei rapporti di efficienza della lotta classica e genetica

Ne risulta che i due metodi si integrano bene potendosi prevedere una prima fase in cui si riduce la popolazione con i metodi convenzionali a disposizione (lotta larvicida e adulticida, rimozione dei focolai) seguita da una seconda fase in cui si implementano i lanci di maschi sterili.

L'approccio ben si presta al caso di *Ae.albopictus* sottoposta in ragione della sua elevata aggressività nei confronti dell'uomo, a più o meno intensi interventi di lotta, dimostrandosi comunque possibile un contenimento delle popolazioni entro livelli decisamente bassi.

Inoltre questa zanzara si presta particolarmente ad applicazioni di metodi di auticidio in considerazione della capacità di colonizzare quasi esclusivamente focolai in zone urbanizzate, determinandosi a tutt'ora una distribuzione a isole che coinvolge un numero ormai imprecisato di centri urbani.

E' ipotizzabile che esista separazione genetica tra popolazioni riferite a centri urbani non contigui, il che diventa un importante fattore di praticità e di vantaggio per il controllo genetico.

Le capacità di dispersione attiva della specie risultano limitate a poche centinaia di metri anche se recenti esperienze sembrano indicare un raggio di spostamento maggiore di quello storicamente accettato (Honório *et al.*, 2003; Liew e Curtis, 2004), mentre inevitabile appare il trasporto passivo a carico degli autoveicoli che si spostano da una zona all'altra. E' altresì logico ipotizzare che questo trasporto passivo possa considerarsi proporzionale alla densità di popolazione e al numero di zone infestate contraendosi fortemente al diminuire degli adulti sul territorio ed all'aumentare della distanza tra i siti considerati.

Trattandosi di specie di recente introduzione a seguito di importazione artificiale di un numero probabilmente esiguo di individui è ipotizzabile che la base genetica sia alquanto ristretta e che scarse o assenti siano sub-popolazioni con caratteristiche riproduttive tali da non essere compatibili col materiale lanciato (Sabatini *et al.*, 1990; Urbanelli *et al.*, 2000).

In effetti la presenza di sub-popolazioni con diverso grado di separazione riproduttiva è stata osservata a carico di diverse specie e fonte di problemi nel caso di programmi SIT contro *C.hominivorax* (Richardson *et al.*, 1982) e *C.capitata* (Shelly *et al.*, 2003).

Le ricerche finora svolte dal nostro gruppo su *Ae.albopictus* hanno consentito di:

1. sviluppare una tecnica di raccolta delle uova assai efficace e di semplice conduzione che permette l'utilizzo di materiale raccolto in natura per il continuo rinsanguamento del ceppo allevato (Bellini *et al.*, 1996);
2. standardizzare le fasi dell'allevamento in modo da disporre di materiale omogeneo per taglia e tempo di sviluppo larvale (Medici *et al.*, 2000).

Da segnalare infine che, stranamente, *Ae.albopictus* non risulta sia mai stata oggetto di attenzioni specifiche nell'ambito degli studi finora condotti contro le zanzare col metodo del maschio sterile.

2. MATERIALI E METODI

L'attività di ricerca svolta nell'ambito del Dottorato di Ricerca XX Ciclo ha avuto come scopo la messa a punto di alcune metodiche di allevamento massale e di sterilizzazione in grado di permettere la produzione di maschi di qualità sufficiente a garantire una buona fitness nelle condizioni di campo e competitività coi maschi selvatici nella fase di accoppiamento.

Le prove condotte possono essere raggruppate sotto tre principali campi di indagine:

Prove di Allevamento, Prove di Irraggiamento e Prove di Competizione.

2.1 - Ambiente di prova e popolazione impiegata

Le prove di allevamento e di sterilizzazione di seguito presentate sono state condotte all'interno di celle climatizzate con i seguenti parametri ambientali: $27 \pm 1^\circ\text{C}$, 80% UR, fotoperiodo 15:9 [L:D] h.

Le prove di competizione in semicampo sono state condotte in serra (8x4,8x2,8m) in un'area ombreggiata nel corso dell'Estate 2006 e 2007.

Per le prove sono state impiegate popolazioni provenienti da allevamento e popolazioni selvatiche ottenute cioè dalla schiusura in laboratorio di uova raccolte in campo.

Le seguenti procedure sono quelle comunemente impiegate nell'allevamento di Culicidi del genere *Aedes* presso il laboratorio di Entomologia Medica e Veterinaria del Centro Agricoltura Ambiente "G.Nicoli" di Crevalcore (Bologna), luogo nel quale si sono svolte gran parte delle attività di Ricerca del Dottorato.

Gli adulti di diversi ceppi sono mantenuti in cella climatizzata all'interno di gabbie di plexiglas (50x50x50cm) ed alimentati con tamponi di carta assorbente imbevuti con soluzione zuccherina al 10% posizionati all'interno delle gabbie. Alle femmine viene offerto periodicamente un pasto di sangue bovino alla temperatura di 37°C attraverso l'impiego di un apparecchio a coppa termostato prodotto artigianalmente (*Long Life Project Srl - Bologna*). Le femmine possono accedere al pasto perforando una membrana costituita da budello intestinale ovino posizionato a guisa di tappo sull'apparecchio.

Il sangue animale reperibile presso impianti di macellazione viene immediatamente defibrinato meccanicamente attraverso l'agitazione dello stesso in un matraccio contenente biglie di vetro corrugate. Il sangue, allontanato dalla sostanza fibrosa, può essere conservato a $4-5^\circ\text{C}$ per alcuni giorni in attesa di essere offerto alle femmine per il pasto. Le uova maturate con la digestione del pasto vengono deposte sopra strisce di carta filtro umide posizionate in Becher (\varnothing 7cm, h 10cm) all'interno delle gabbie a 36-48 h dal pasto. Le strisce di carta filtro sulla cui superficie sono state deposte le uova sono rimosse dalle gabbie di allevamento e una volta asciutte vengono conservate in scatole di plastica contenenti una soluzione satura di K_2SO_4 . Dalla schiusa di queste uova si possono ottenere, secondo necessità, le larve necessarie alle sperimentazioni o semplicemente al mantenimento della colonia.

Allo scopo di ottenere larve ad una densità prefissata, è stato sviluppato un metodo automatico e rapido per il conteggio delle uova utilizzando un programma di analisi delle immagini (*ImageJ - US National Institute of Health*). Un metodo pratico per standardizzare la schiusura delle uova è stato sviluppato in modo da ottenere un numero preciso di larve di primo stadio partendo da un numero conosciuto di uova. Una cultura di brodo (*Bacto Nutrient Broth*) batterico nutriente viene utilizzata per ottenere acqua deossigenata biologicamente in contenitori ermetici di vetro. Le larve vengono allevate in vaschette

bianche di plastica (41x31x11 cm) contenenti 3 litri di acqua dechlorata ossigenata mediante tubi di areazione.

Alle larve viene offerta una dieta standardizzata pari a 2,48 mg/larva (2,1 mg/larva *Friskies® Adults* cibo per gatti secco+ 0,38 mg/larva di lievito di birra) fornita il 10% al primo giorno, 20% al secondo, 30% al terzo e 40% al quarto giorno (Trembley, 1944; USDA ARS, 1955; Asahina, 1964)

Per l'ottenimento di pupe maschio è impiegata una tecnica di setacciamento attraverso l'impiego di griglie a maglia quadrate di apertura 1.400 µm (Medici, 2000). Tale tecnica, sfruttando il dimorfismo sessuale riscontrabile nello stadio pupale tra maschi e femmine di *Ae. albopictus*, garantisce una buona efficacia nella separazione dei sessi.

2.2 - Prove di Allevamento

2.2.1 - Prova dieta

Nel corso di queste prove è stata esaminata una nuova dieta larvale al fine di ottenere una più elevata produttività in termini di pupe con tempi di impupamento e dimensioni delle pupe più omogenei.

Come riportato da Timmermann e Briegel (1999) la dieta delle larve va strutturata con l'obiettivo di garantire un ampio range di elementi nutritivi evitando così il rischio di carenze o sub-carenze che possano influire negativamente sulla produttività dell'allevamento e sulle condizioni di vigore dei maschi. Secondo Reisen (1980, 1982) l'influenza negativa dell'allevamento sulla competitività dei maschi nella fase di accoppiamento potrebbe essere di maggiore peso rispetto all'influenza dell'irraggiamento dei maschi.

Sono state condotte 6 repliche in vasche di plastica bianca (41x31x11cm) con 4.000 larve in 3 litri di acqua dechlorata (1333 larve/litro) aggiungendo, alla dieta standard solitamente utilizzata per gli allevamenti (2,1 mg/larva di biscotti per gatti *Friskies Adult®* + 0,38 mg/larva di lievito di birra) 0,15 mg/larva di cibo per pesci *Tetramin®* (Kardatzke e Liem, 1972; Pappas 1973). La dieta integrata (DI) è stata fornita il 10% a 1 giorno, il 45% a 2 giorni e il restante 45% a 5 giorni di età. Si sono analizzati i valori di impupamento delle larve e la quota di pupe maschili ottenute con il setacciamento condotto su tutte le pupe ottenute a 7 giorni di età. I risultati ottenuti sono stati confrontati con i parametri ottenuti con la dieta standard non addizionata *Tetramin®*.

2.2.2 - Prova ATP

La necessità di incrementare la produttività di uova dell'allevamento ci ha spinto a valutare la possibile azione fagostimolante dell'ATP addizionato al pasto di sangue (Rutledge et. al, 1964) sulle femmine adulte di *Ae. albopictus* in allevamento.

Come noto le zanzare traggono nutrienti dall'acqua, dal nettare, da soluzioni zuccherine e dal sangue. Quando le femmine di zanzara effettuano un pasto di sangue, assumono una grande quantità di liquido che viene accumulato nel loro intestino (Galun et.al, 1985). Il loro comportamento durante la suzione è inizialmente innescato dalla temperatura ma viene successivamente influenzato da sostanze fagostimolanti presenti nelle frazioni cellulari del sangue (Friend, 1978). Diverse specie di zanzara

mostrano la possibilità di effettuare il pasto suggendo da soluzioni saline contenenti nucleotidi di adenina e in studi condotti su *Culex pipiens* (Hosoi, 1959), *Aedes aegypti* (Galun e Rice, 1971) e *Culiseta inordata* (Friend, 1978) le femmine rifiutano di effettuare il pasto su sangue raggrumato povero di plasma o su soluzioni saline proprio in funzione dell'assenza di nucleotidi adenina. L'impiego di ATP e in maggior misura di alcuni suoi analoghi chimici (Galun *et al.*, 1985 b) è suggerito per incrementare l'attività fagostimolante nelle femmine di *Ae. aegypti*.

Sono state condotte prove di laboratorio per la verifica dell'efficacia fagostimolante di ATP addizionato al pasto di sangue offerto alle femmine di *Ae. albopictus* in allevamento.

Sono state preparate 6 gabbie (30x30x30 cm) contenenti 50 femmine feconde di 6 giorni di età.

Tre gabbie sono state alimentate con sangue bovino defibrinato (6 ml sangue) e tre con sangue bovino defibrinato addizionato con ATP (6 ml di sangue + 0.017 g di ATP).

Il sangue è stato offerto alle zanzare alla temperatura di 37°C per 20' in ogni gabbia. L'analisi della prova è avvenuta attraverso la valutazione del numero di femmine con pasto e del relativo numero di uova per femmina deposte. Dopo 6 giorni è stata replicata la prova in tutte le gabbie.

2.3 - Prove di Sterilizzazione

Sono state condotte prove di laboratorio per la verifica dell'efficacia sterilizzante di diverse dosi radianti sui maschi di *Aedes albopictus*. Le prove hanno investigato gli effetti delle radiazioni sulla longevità dei maschi e sulle loro capacità di accoppiarsi e rendere sterili le femmine. Si sono compiute prove per l'individuazione della minor dose radiante efficace e per la ricerca dello stadio di sviluppo più idoneo all'irraggiamento dei maschi.

2.3.1 - Prove di irraggiamento 78 - 80 - 85 Gy

In queste prove sono stati investigati gli effetti sterilizzanti di diverse dosi radianti (78, 80 e 85 Gy) sulle pupe maschio per la verifica del livello di sterilità indotta sulle femmine. Si sono inoltre compiute prove di irraggiamento su pupe di diversa età per valutare eventuali alterazioni dello stato fisiologico e del livello di sterilità dei maschi in funzione del grado di sviluppo della metamorfosi.

Le pupe utilizzate in queste prove sono state ottenute da allevamenti larvali condotti in vasche di plastica (41x31x11 cm) con densità controllata (1333 larve/lt) e dieta standard arricchita (*Tetramin*®). Per la separazione dei sessi allo stadio pupale è stata impiegata la tecnica del setacciamento del campione su griglie a maglie quadrate da 1400 µm (*Giuliani*®). Il materiale da irraggiare è stato trasportato presso il Centro di Fisica Sanitaria dell'Ospedale S. Anna di Ferrara (Direttore Dott. Candini) e disposto in acqua in capsule Petri (Ø12cm) impilate all'interno dell'apposito contenitore di irraggiamento. L'irraggiamento delle pupe maschili è avvenuto attraverso l'impiego di un irradiatore per emoderivati al Cs 137 (Mod. IBL437C Type H - CIS Biointernational®)(Fig.2.1).

Le prime prove sono state realizzate prove con dosi di irraggiamento di 78, 80 e 85 Gy su pupe di età inferiore alle 48h. In laboratorio 50 pupe irraggiate sono state trasferite in vaschette di plastica e posizionate in gabbia (50x50x50 cm) insieme a 50 femmine vergini.



Fig.2.1 - Irradiatore per emoderivati al Cs 137 Mod. IBL437C Type H - CIS Biointernational ® (Ospedale S.Anna di Ferrara - Dip.to di Fisica Sanitaria) - Container per l'alloggiamento del materiale da irraggiare - Posizionamento delle pupe da irraggiare nelle capsule Petri.

Per investigare le cause della ampia variabilità dei livelli di fertilità residua riscontrati nella prima prova per le dosi testate, sono state condotte ulteriori prove sottoponendo pupe di 5 differenti fasce di età (2-7h; 2-14h; 7-22h; >14h; >22h) a 85Gy di irraggiamento. In laboratorio 50 pupe irraggiate per ogni età testata, sono state trasferite in vaschette di plastica e posizionate in gabbia (teca di plexiglas 50x50x50 cm) insieme a 50 femmine vergini. L'analisi dei livelli di sterilità ottenuti nelle diverse prove è avvenuta attraverso l'osservazione delle percentuali di schiusura delle uova deposte dalle femmine. Nel corso delle prove è stata inoltre osservata la mortalità del campione irradiato a seguito dei diversi trattamenti.

2.3.2 - Prove di irraggiamento 40, 60, 80 Gy su pupe maschio di età 16-24h, 24-40h e 40-48h

Nel corso della precedente prova di irraggiamento era stata accertata la diversa sensibilità all'irraggiamento in funzione dell'età delle pupe. In particolare si era osservato come pupe di età superiore a 14h fossero più idonee all'irraggiamento riportando minore mortalità e una maggiore sensibilità alle radiazioni rispetto alle pupe irraggiate più precocemente (< 14h). Con questa prova si è voluto andare a valutare la possibilità di impiego di dosi radianti inferiori su pupe maschio di età superiore alle 16h.

Nelle prove di laboratorio sono stati quindi investigati in gabbia (teca di plexiglas 50x50x50cm) gli effetti sterilizzanti di diverse dosi radianti (40, 60 e 80Gy) sulle pupe maschio di *Ae.albopictus* di diversa età (16-24 h, 24-40 h, e 40-48 h) per valutare eventuali alterazioni dello stato fisiologico e del livello di sterilità dei maschi in funzione del grado di sviluppo della metamorfosi.

I ceppi impiegati in queste prove provengono da materiale raccolto in campo a Pinerolo - Torino (All. P) e Rimini (All. R) e allevati in gabbia (50x50x50 cm) rispettivamente per 21 e 22 generazioni.

Le larve sono state allevate con dieta integrata e densità 1333 larve litro. Le pupe impiegate per le prove sono state sessate a 16-24 h, 24-40 h, e 40-48 h dall'inizio dell'impupamento utilizzando il metodo del setacciamento del campione su griglie a maglie quadrate da 1400 µm. L'irraggiamento delle pupe è avvenuto in acqua attraverso l'impiego di un irradiatore a Cs137 per emoderivati.

In laboratorio campioni di 50 pupe maschili irraggiate di ciascuna età sono stati trasferiti in vaschette di plastica e posizionati in gabbia insieme a 50 femmine vergini provenienti dalla medesima colonia impiegata per l'ottenimento dei maschi. Gabbie testimone erano allestite parallelamente per ciascuna età pupale testata con maschi e femmine fertili, per la misura dei livelli naturali dei parametri in esame.

L'analisi dei livelli di sterilità ottenuti con il trattamento radiante è avvenuta attraverso l'osservazione delle percentuali di schiusura delle uova deposte dalle femmine di ciascuna gabbia a seguito di tre pasti di sangue bovino.

Per l'analisi dei dati percentuali relativi alle prove di irraggiamento condotte sulle pupe maschili delle tre diverse fasce di età G, M e V (corrispondenti rispettivamente a 16-24 h, 24-40 h, e 40-48 h) è stata effettuata una trasformazione angolare ed è stato utilizzato il test di Newman-Keuls come test per la separazione delle medie. Nel corso della prova è stata anche valutata la percentuale di sopravvivenza degli insetti attraverso il conteggio giornaliero dei morti all'interno delle gabbie di prova. L'analisi dei dati di sopravvivenza è stata effettuata mediante Kaplan-Meier Survival Analysis.

Le curve ottenute per ogni radiazione sono state confrontate fra loro mediante il Log-Rank test.

2.3.3 - Prova di irraggiamento a 20, 30, 40 e 50 Gy su pupe maschio di età 16-30h e 30-40h

L'impiego della minima dose radiante efficace, significa ridurre lo stress provocato inevitabilmente alle pupe maschio, che si manifesta nell'adulto con una ridotta longevità, una diminuita capacità di accoppiamento o di ricerca del partner e attraverso possibili alterazioni comportamentali che possono rendere il maschio inattivo o inefficace una volta introdotto in campo.

Recenti prove di sterilizzazione condotte su diversi stadi di sviluppo in *Anopheles stephensi* hanno dimostrato come l'irraggiamento su esemplari adulti garantisca il mantenimento della competitività del campione trattato rispetto all'irradiazione dello stadio pupale (Andreasen e Curtis, 2005).

Prove comparative di irraggiamento condotte su pupe e adulti di *Anopheles arabiensis* (Helinski et al., 2006) hanno però evidenziato come lo stadio di sviluppo più conveniente da impiegare per l'irraggiamento di zanzare provenienti da allevamenti massali sia quello pupale. Gli effetti dell'irraggiamento condotto su adulti (età < 24h) e su pupe di 22-26h di età, non mostrava infatti differenze significative né nei livelli di sterilità raggiunti né nella sopravvivenza dei campioni trattati. Oltre alla sopravvivenza e alla sterilità, la scelta dello stadio di sviluppo più conveniente da irraggiare in un programma SIT dipende dalla possibilità di maneggiare in sicurezza grandi quantità di insetti senza danneggiarli durante tutte le fasi che intercorrono tra l'allevamento massale, l'irraggiamento e il lancio in campo. La fase pupale risulta sicuramente più vantaggiosa per il maggior numero di pupe irraggiabili per unità di volume e per il minimo danneggiamento arrecabile all'insetto che viene mantenuto in acqua durante tutte le procedure.

Per il proseguimento delle nostre sperimentazioni volte alla valutazione delle possibilità applicative della tecnica del maschio sterile su *Ae. albopictus*, si è deciso quindi di non intraprendere la sperimentazione su adulti concentrando i nostri studi sull'impiego di esemplari in fase pupale. Sulla base dei risultati ottenuti con le prove di irraggiamento a 40, 60 e 80 Gy su pupe maschio è stato possibile osservare un effetto dell'età di irraggiamento sulla longevità dei maschi, mentre non si sono osservate differenze alle diverse età pupali nei livelli di sterilità indotti sulle femmine.

Allo scopo di verificare l'efficacia sterilizzante sui maschi a dosi di irraggiamento inferiori, sono state realizzate prove di irraggiamento a 20, 30, 40 e 50Gy (Cs137) su pupe maschio di età 16-30 h.

In questa prova sono stati impiegati 3 ceppi provenienti da materiale raccolto in campo a Pinerolo, Rimini e Cesena. Le 3 popolazioni in esame sono state allevate in gabbia (teca di plexiglas 50 x 50 x 50 cm) rispettivamente per 22 (**PIN 22**), 23 (**RIM 23**) e 20 (**CES 20**) generazioni. Per il ceppo di Rimini sono state realizzate ulteriori prove di irraggiamento a 20, 30, 40 e 50Gy su pupe maschio 30-40 h di età.

Sono stati testati maschi provenienti da ceppi diversi per verificare eventuali differenze nella fitness nelle popolazioni impiegate attraverso la verifica della longevità, della fecondità e della fertilità residua di ciascun ceppo. In laboratorio campioni di 50 pupe maschili irraggiate alle diverse dosi e per le diverse età testate sono state trasferite in gabbia insieme a 50 femmine vergini provenienti dalla medesima colonia impiegata per l'ottenimento dei maschi. Gabbie testimone erano allestite parallelamente per ciascuna età pupale testata con maschi e femmine fertili, per la misura dei livelli naturali dei parametri in esame. Le prove sono state condotte all'interno di celle climatizzate con temperatura ambientale di $28 \pm 1^\circ\text{C}$, umidità relativa 85% UR e fotoperiodo 15:9 [L:D] h.

L'analisi dei livelli di sterilità ottenuti è avvenuta attraverso l'osservazione delle percentuali di schiusura delle uova deposte dalle femmine di ciascuna gabbia a seguito della somministrazione di 1-2 pasti di sangue bovino forniti a ciascuna gabbia. La fecondità delle femmine è stata valutata attraverso l'analisi del numero di uova deposte dalle femmine accoppiate con i maschi irraggiati alle diverse dosi. Per l'analisi dei dati percentuali relativi alle prove di irraggiamento condotte è stata effettuata una trasformazione angolare ed è stato utilizzato il test di Newman-Keuls come test per la separazione delle medie. La fertilità residua (% di uova schiuse) alle diverse radiazioni è stata corretta con il testimone mediante la formula di Abbott ed è stata realizzata una trasformazione NED Normal Equivalent Deviates delle percentuali, mentre le dosi di radiazione sono state trasformate in Log base 10 per ottenere una relazione lineare tra la dose ed il residuo di fertilità. Durante tutte le prove è stata poi valutata la percentuale di sopravvivenza degli insetti irraggiati attraverso il conteggio giornaliero dei morti all'interno delle gabbie di prova. L'analisi dei dati di sopravvivenza è stata effettuata mediante Kaplan-Meier Survival Analysis.

Le curve ottenute per ogni radiazione sono state confrontate fra loro mediante il Log-Rank test.

2.4 - Prove di Competizione

2.4.1 - Prove preliminare in tunnel 2006 (50 - 60 Gy)

E' riconosciuto che nella fase di allevamento in laboratorio si verifica una diminuzione della diversità genetica per effetto casuale legato a fenomeni di inbreeding con ripercussione sulla capacità riproduttiva, e un progressivo adattamento alle condizioni artificiali, con conseguente perdita dei genotipi più adatti alle condizioni di campo e riduzione delle performance dei maschi allevati una volta reintrodotti in natura (Asman *et al.*, 1987) (Coppel e Merlins, 1977). L'adattamento alle condizioni di laboratorio da parte delle popolazioni allevate in laboratorio è in parte fisiologico e rappresenta la temporanea risposta degli insetti al cambiamento delle loro condizioni di vita ed è in parte dovuto a variazioni genetiche ereditabili dalla progenie. Molti cambiamenti sono apportati da fenomeni di selezione accidentale, non

pianificata e non guidata dagli operatori. In studi condotti da McDonald, (1979) su popolazioni di *Culex tarsalis* raccolte in campo e allevate in laboratorio, si evidenziava un adattamento della colonia alle condizioni artificiali di allevamento dopo la quarta generazione. In studi sulla diapausa condotti su *Ae. albopictus*, Mousseau (2000) impiegava popolazioni mantenute in gabbia per 1-3 generazioni per minimizzare gli effetti non genetici materni sul comportamento degli adulti.

In studi condotti da Reisen (1981) irraggiando a 60 Gy maschi di *Culex tarsalis*, raccolti come pupe in natura si induceva una sterilità nella popolazione selvatica pari a quella attesa sulla base di un coefficiente di competizione di 1 : 1. Utilizzando invece materiale in allevamento da 9-16 generazioni la sterilità indotta nella popolazione selvatica era più bassa indicando una competitività dei maschi sterili del 29 % (Reisen et al., 1982).

Per la verifica della variazione di fitness dovuta all'allevamento forzato degli adulti in gabbia, sono quindi stati testati in campo i livelli di competizione tra maschi sterili e fertili provenienti da materiale raccolto in campo e dal laboratorio. Il raffronto tra il materiale raccolto in campo con quello proveniente da ceppi mantenuti in allevamento da diverse generazioni (> 5) era finalizzato all'analisi di possibili effetti negativi sulla capacità di accoppiamento provocati dall'inbreeding, fenomeno che tende a incrementare l'omozigosi su popolazioni a ridotto numero di individui aumentando così l'espressione di caratteri recessivi.

Prove preliminari sono state realizzate all'interno di un'area privata isolata e naturalmente ombreggiata, nella quale sono stati allestiti 4 tunnel serra costituiti da rete ombreggiante montata e fissata su impalcatura metallica ad archi (8x5x2,8 m) (Fig.2.2). Su pupe irraggiate alla dose di 50 e 60 Gy (età pupe 16-48 h) si sono realizzate prove di competizione introducendo in tunnel 100 maschi fertili 100 maschi sterili e 100 femmine vergini. Tunnel testimone con 100 femmine vergini e 200 maschi fertili erano realizzati per la verifica delle naturali percentuali di schiusura per i ceppi di allevamento e di campo impiegati. I ceppi impiegati per le prove erano entrambi provenienti da Rimini. I ceppi di allevamento (**A**) erano mantenuti in allevamento per 5 e 6 generazioni (**RIM 5** , **RIM 6**), mentre i ceppi selvatici (**S**) erano raccolti dal campo ed impiegati senza nessun passaggio degli adulti in gabbia(**RIM 0**). Le prove sono state condotte realizzando tunnel testimone **A_A** e **S_S** impiegando cioè maschi e femmine fertili di allevamento (**RIM 5** e **RIM 6**) e selvatici (**RIM 0**).

I tunnel di competizione allestiti sono stati identificati con i codici **SA_S** , **AS_S** , **AA_A** e **SS_S** dove le lettere si riferiscono rispettivamente alla provenienza di maschi sterili, maschi fertili e femmine fertili impiegati nelle diverse prove (♂sterili ♂fertili_♀fertili).

Le pupe ottenute da allevamento larvale in densità controllata e dieta integrata sono state setacciate a 16-48 h dall'impupamento e irraggiate attraverso l'impiego di un irradiatore a sorgente Cs 137 per emoderivati. I maschi sterili e fertili di *Ae.albopictus* impiegati per la sperimentazione sono stati posizionati in tunnel allo stadio pupale mentre le femmine sono state inserite allo stadio adulto (20-24h di età) il giorno seguente il posizionamento dei maschi.



Fig.2.2 - Tunnel a rete ombreggiante (8x5x2,8 m) impiegati per le prove di competizione (2006 - 2007)

Nei tunnel, insieme alle femmine, sono stati posizionati tamponi di carta assorbente imbevuti di soluzione zuccherina al 10% per l'alimentazione degli adulti. A quattro giorni dall'inserimento delle femmine in tunnel, è stato offerto loro un pasto di sangue posizionando al contempo quattro ovitrappole a listelle di masonite per ciascun tunnel in quattro zone ombreggiate. In ciascuna prova e per ogni tunnel sono stati realizzati tre pasti di sangue.

Sono state realizzate complessivamente 4 prove in tunnel. Le prove in tunnel sono state condotte dal 20 Giugno al 31 Agosto 2006 in località Anzola dell'Emilia (Bologna). Per tutto il periodo di svolgimento delle prove sono stati annotati i valori di temperatura minima e massima di precipitazione e di umidità relativa media registrati dalle stazioni del Servizio Meteorologico Regionale *ARPA*.

L'analisi dei dati per la verifica della fertilità e della fecondità degli adulti testati è avvenuta attraverso l'osservazione in laboratorio delle percentuali di schiusura delle uova raccolte nei tunnel al termine delle prove. Parallelamente alle prove in tunnel erano condotte in laboratorio prove in gabbia con i medesimi ceppi testati in campo. I risultati ottenuti da queste prove di laboratorio sono state necessari per la correzione del livello di competitività in tunnel dei maschi sterilizzati.

Per quantificare la competitività in tunnel è stata impiegata la **Formula di Fried** (Fried, 1971) definita dalla relazione:

$$C = (N/S) * [(Hn-Ho)/(Ho-Hs)]$$

Dove:

N – N° maschi non irraggiati

S – N° maschi irraggiati

Hn – % Uova schiuse nel tunnel testimone (maschi fertili)

Hs – % Uova schiuse in lab (maschi sterili trattati in laboratorio alla dose di raggi specifica)

Ho – % Uova schiuse osservata nel tunnel competizione (maschi sterili + fertili)

La comparazione con le uova schiuse osservate in competizione **Ho** (maschi fertili + maschi sterili) indica il livello di competitività. Tale valore necessita di correzione con la percentuale di schiusura dei tunnel testimone e con il residuo di fertilità osservato in laboratorio per la dose di radiazioni testata.

Nel corso delle prove giornalmente si è provveduto all'irrigazione del terreno all'interno dei tunnel per garantire agli insetti buoni livelli di umidità.

Sulla base della grande variabilità dei dati osservati nel corso delle prove di competizione e degli elevati valori degli indici di Fried si sono condotte prove in laboratorio per l'analisi degli effetti delle radiazioni sui tempi di rotazione genitale, sulla velocità ed efficacia degli accoppiamenti e sui tempi di sfarfallamento dei maschi irraggiati a differenti dosi.

Su femmine di *Ae. albopictus* si sono poi realizzate prove in gabbia per lo studio dei tempi fisiologici necessari per raggiungere la completa recettività all'accoppiamento. L'età di irraggiamento delle pupe per queste ulteriori prove di laboratorio è stata scelta all'interno del range di età impiegato per le prove in tunnel 2006 (16-48h).

2.4.2 - Analisi dell'efficacia di accoppiamento nei maschi irraggiati

Per la valutazione della fitness dei maschi di allevamento irraggiati alle dosi 30, 40 e 50 Gy, è stata confrontata la capacità di accoppiamento in gabbia dei maschi irraggiati con quella mostrata da maschi fertili provenienti dallo stesso ceppo in esame. Utilizzando maschi irraggiati a 30, 40 e 50 Gy in età pupale di 16-40h provenienti dal ceppo di allevamento **RIM 15** sono state eseguite prove preliminari per la valutazione della capacità di accoppiamento dei maschi a 3, 4 e 5 giorni di età in funzione del testimone non irraggiato. Le prove sono state realizzate introducendo in ciascuna gabbia 1 maschio e 10 femmine vergini (età > 48h) per tempi di 2, 4 e 24 ore. L'analisi dei risultati avveniva, al termine del tempo di prova, attraverso l'analisi dello stato di fecondazione delle femmine mediante verifica della presenza di spermatozoi nelle 3 spermateche femminili (1/3, 2/3, 3/3).

Una seconda prova è stata condotta su maschi di allevamento (**RIM 16**) irraggiati in età pupale di 30-40h a 30, 40 e 50 Gy nella quale per ogni dose testata e per il testimone non irraggiato è stata allestita una gabbia contenente 4 maschi di età superiore alle 24h e 20 femmine vergini (età > 48h) di provenienza dallo stesso ceppo. Nel corso delle 4 ore di durata della prova sono stati registrati in continuo in ogni gabbia il numero di accoppiamenti effettuati. Al termine della prova sono poi state analizzate le spermateche delle femmine per la verifica dello stato di accoppiamento e per l'analisi del numero di accoppiamenti utili realizzati dai maschi.

2.4.3 - Analisi della precocità di sfarfallamento nei maschi irraggiati

Su pupe maschio irraggiate in età pupale di 30-40h a 20, 30, 40 e 50Gy sono state condotte osservazioni sui tempi di sfarfallamento attraverso il conteggio ogni 30 minuti e la rimozione progressiva delle esuvie pupali. Un'ulteriore prova di irraggiamento a 60 Gy su pupe di età 30-40h è stata realizzata con la medesima procedura di indagine per la valutazione del dato di sfarfallamento a dosi superiori.

Per le prove di verifica della precocità di sfarfallamento sono stati impiegati maschi provenienti dal ceppo di allevamento **RIM 15** per la prima prova, e dal ceppo di allevamento **RIM 16** per la seconda prova.

L'analisi dei dati ottenuti è avvenuta attraverso l'analisi della varianza.

2.4.4 - Analisi dei tempi di rotazione dei genitali esterni nei maschi irraggiati

I maschi di tutte le specie di zanzara necessitano di tempi più o meno lunghi dopo lo sfarfallamento per completare la loro maturazione sessuale ed essere così in grado di realizzare accoppiamenti efficaci.

La maturazione sessuale nei maschi comprende la capacità di erezione delle fibrille antennali e rotazione di 180° della struttura terminale dei genitali (terminalia). In *Aedes aegypti* il completamento dell'inversione dell'ultimo segmento addominale avviene tra le 18 e le 24 ore dallo sfarfallamento. I maschi di questa specie mostrano attrazione nei confronti delle femmine già tra le 12 e le 36 ore dallo sfarfallamento, tempo nel quale si completa la distensione delle fibrille antennali (Beach, 1980). Nelle condizioni di sperimentazione realizzate nelle prove in tunnel, una eventuale alterazione dei tempi di rotazione genitale nei maschi irraggiati, potrebbe portare una grande variabilità nelle capacità competitive dei maschi in esame.

Su maschi di *Aedes albopictus* di allevamento (**RIM 22**) irraggiati a 40, 50, 60 e 80Gy in età pupale di 16-30h, sono state condotte analisi per la verifica dei tempi di rotazione delle strutture genitali terminali in confronto a maschi adulti testimoni non irraggiati. Gruppi di maschi adulti sono stati prelevati per le diverse dosi e per il testimone non irraggiato a diverse fasce di età (0-18h, 18-20h e 20-24h) per la verifica di eventuali alterazioni nei tempi necessari alla completa rotazione.

2.4.5 - Analisi della recettività all'accoppiamento delle femmine

Lo stato di recettività all'accoppiamento si riflette sulle risposte comportamentali che le femmine offrono ai tentativi di accoppiamento dei maschi. Femmine vergini recettive rispondono ai maschi estendendo la porzione terminale dell'addome e in generale permettendo al maschio di completare con successo l'inseminazione. Al contrario femmine giovani sessualmente immature o femmine già inseminate rispondono all'accoppiamento ritirando le porzioni esterne dei genitali e respingendo attivamente i maschi.

Le femmine di molte specie di zanzare non sono sessualmente recettive nelle prime 30-60h della loro vita adulta e durante questo periodo possono effettuare accoppiamenti con maschi senza però rimanere inseminate (Clements, 1999). Quando giovani femmine di *Ae. aegypti* erano posizionate in gabbia con maschi sessualmente maturi alla temperatura di 27°C, nessuna femmina di 24 h di età risultava inseminata mentre femmine di 48 h di età presentavano spermatozoi solo nel 40% dei casi. In questo studio la

completa recettività delle femmine di *Ae.aegypti* si otteneva per femmine di 72h di età. In esperimenti paralleli condotti su *Ae. albopictus* solo l'11% delle femmine di 48 h di età risultava inseminata. Quando le prove erano realizzate a 30°C, l'11% delle femmine di 24h di *Ae. aegypti* erano inseminate mentre per femmine di 48 h la percentuale saliva al 90% (R.W. Gwadz e G.B. Craig, 1968).

L'età alla quale le femmine di *Aedes albopictus* diventano recettive all'accoppiamento è stata investigata attraverso prove di laboratorio compiute su insetti provenienti dal ceppo di allevamento **RIM 16**. Tale studio è stato condotto in 11 gabbie di plexiglas contenenti 10 femmine vergini di diverse età nelle quali sono stati inseriti per 2 ore 10 maschi di età superiore a 24 h. La verifica dello stato di accoppiamento delle femmine avveniva attraverso l'analisi al microscopio delle spermateche per evidenziare l'eventuale presenza di spermatozoi. Le prove di recettività sono state condotte all'interno di celle climatizzate con parametri ambientali: $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 80% UR, fotoperiodo 15:9 [L:D] h.

2.4.6 - Prove in tunnel 2007 (40 Gy)

Le prove di competizione in tunnel svolte nel 2006 su ceppi selvatici e di allevamento avevano mostrato risultati di competitività dei maschi sterili (50, 60Gy) segnati da forte variabilità.

Nel 2007 dopo aver condotto analisi per la verifica dei tempi di sfarfallamento, di accoppiamento e di rotazione genitale nei maschi sterilizzati, e di recettività nelle femmine, sono state realizzate nuove prove in tunnel.

Le prove condotte in laboratorio avevano mostrato come i maschi irraggiati a dosi superiori ai 40Gy subiscano alterazioni nell'efficacia di accoppiamento, nei tempi di maturazione e nella percentuale di sopravvivenza.

Le prove condotte irraggiando a 40Gy pupe maschio di 30-40h hanno inoltre evidenziato una sopravvivenza statisticamente invariata rispetto al testimone.

Dai dati raccolti in laboratorio si poteva inoltre osservare che le femmine di *Ae. albopictus* mostravano piena recettività a una età superiore alle 48h.

Si sono quindi replicate prove di competizione in tunnel (8x5x2,8m) impiegando pupe di età 30-40h irraggiate alla dose di 40 Gy. Si sono introdotti nei tunnel 100 maschi sterili, 100 maschi fertili e 100 femmine vergini (rapporto di competizione 1:1:1), mentre per la realizzazione dei tunnel testimone le 100 femmine vergini erano introdotte in tunnel con 200 maschi fertili.

Le pupe ottenute da allevamento sono state quindi setacciate a 30-40h dall'impupamento e irraggiate attraverso l'impiego di un irradiatore a sorgente Cs 137 per emoderivati presso il Dipartimento di Fisica Sanitaria dell'ospedale S. Anna di Ferrara.

I maschi sterili e fertili di *Ae.albopictus* impiegati per la sperimentazione sono stati posizionati in tunnel allo stadio pupale mentre le femmine sono state inserite allo stadio adulto 3 giorni dopo il posizionamento dei maschi. Le femmine inserite nei tunnel avevano 6 giorni di età. A due giorni dall'inserimento delle femmine in tunnel, è stato offerto loro un pasto di sangue posizionando al contempo quattro ovitrappole a listelle di masonite in 4 zone ombreggiate di ciascun tunnel. In ciascuna prova e per ogni tunnel è stato realizzato un unico pasto di sangue con conteggio delle femmine che effettuavano il pasto.

Sono stati utilizzati insetti provenienti da materiale raccolto in campo (cicli di allevamento in gabbia < 5) e dal laboratorio (cicli di allevamento in gabbia > 5). Sono stati inoltre testati in laboratorio e in tunnel ceppi ibridi per valutare l'eventuale effetto dell'eterosi sul miglioramento della fitness dei maschi trattati. I ceppi ibridi sono stati testati sia in rapporto a materiale proveniente dal campo che nei confronti di materiale allevato in laboratorio. Le prove sono state condotte realizzando tunnel testimone **A_A** e **S_S** impiegando cioè maschi e femmine fertili di allevamento (**RIM 18**) e selvatici (**RIM 0**).

I tunnel di competizione allestiti sono stati identificati con i codici **IA_A**, **AI_A**, **JA_A**, **AJ_A**, **IS_S**, **SI_S**, **YS_S**, **SY_S** e **AA_A**, dove le lettere si riferiscono rispettivamente alla provenienza di maschi sterili, maschi fertili e femmine fertili impiegati nelle diverse prove (♂sterili ♂fertili_♀fertili). I ceppi ibridi impiegati e segnalati con le lettere **I**, **J**, e **Y** sono stati realizzati attraverso incroci tra i seguenti ceppi di allevamento ♂**Rimini 18** X ♀**Cesena 18** (Ceppo **I**), ♂**Cesena 18** X ♀**Rimini 18** (Ceppo **J**), **Matera 5 x Pinerolo 20** (Ceppo **Y**). Il ceppo ibrido **Y** è stato realizzato incrociando una popolazione di allevamento (**PIN 20**) e una popolazione di campo (**MAT 5**) raccolte in due aree geograficamente molto lontane.

Gli insetti ibridi impiegati nei tunnel erano quindi la F1 dei diversi incroci descritti.

Nel corso delle prove giornalmente si è provveduto all'irrigazione del terreno all'interno dei tunnel per garantire agli insetti buoni livelli di umidità. Sono state realizzate complessivamente 6 prove in tunnel. Le prove sono state condotte dal 15/05/2007 al 22/08/2007 in località Anzola dell'Emilia (Bologna). Per tutto il periodo di svolgimento delle prove sono stati annotati i valori di temperatura minima e massima di precipitazione e di umidità relativa media registrati dalle stazioni del Servizio Meteorologico Regionale **ARPA**.

L'analisi dei dati per la verifica della fertilità e della fecondità degli adulti testati è avvenuta attraverso l'osservazione delle percentuali di schiusura delle uova raccolte nei tunnel al termine delle prove.

Per ciascuna prova era realizzato almeno un tunnel testimone con esemplari fertili per la verifica delle naturali percentuali di schiusura nelle condizioni di prova realizzate dei ceppi testati.

Parallelamente alle prove in tunnel erano condotte in laboratorio prove in gabbia con i medesimi ceppi testati in campo. I risultati ottenuti da queste prove di laboratorio sono state necessarie per la correzione del livello di competitività in tunnel dei maschi sterilizzati.

Per quantificare la competitività in tunnel è stata impiegata la formula di Fried.

Per l'analisi dei dati percentuali relativi alle prove di irraggiamento condotte è stata effettuata una trasformazione angolare ed è stato utilizzato il test di Newman-Keuls come test per la separazione delle medie. Le regressioni lineari sono state ottenute a seguito di trasformazione degli assi e correzione della fertilità residua con quella registrata nel testimone (formula di Abbott).

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 - Prove di Allevamento

3.1.1 - Prova dieta

Le prove condotte hanno evidenziato una buona risposta nelle percentuali di impupamento e di produttività in termini di pupe senza però evidenziare miglioramenti significativi con la dieta standard. Con la dieta integrata si ottiene un impupamento a 7 giorni del 66,6% delle larve allevate (65% con la DS) e il setacciamento a 1400 µm delle pupe ottenute produce in media il 98,3% di maschi nel setacciato contro il 98,5% ottenuto con dieta standard. Con la dieta integrata la percentuale di maschi ottenuti sulle larve iniziali è del 27,2% mentre con la dieta standard si raccolgono dal 20 al 25% dei maschi prodotti.

In Tab.3.1 vengono riportati i dati ottenuti con la dieta *Tetramin*®

Tab.3.1 - Dieta integrata

4.000 larve in 3 litri

N	% impupamento a 7 giorni	% maschi nel setacciato	% femmine nel setacciato	% maschi ottenuti sulle larve iniziali
1	81,3	100,0	0,0	25,5
1	69,2	99,0	1,0	35,5
1	55,9	97,5	2,5	25,5
1	64,9	99,2	0,8	22,7
1	65,7	94,8	5,2	28,4
1	62,5	99,3	0,7	25,5
6	66,58 ± 0,08	98,30 ± 0,02	1,70 ± 0,02	27,18 ± 0,04

La dieta all'interno di un progetto di allevamento massale ricopre una grande importanza e risulta essere una delle più importanti voci di spesa. La qualità degli insetti prodotti dipende infatti in larga misura da questo aspetto e lo studio sui parametri di allevamento sono sempre in esame.

Nella realizzazione di allevamenti massali per la produzione di maschi da irraggiare, si ritiene quindi opportuno mantenere la nuova dieta testata che garantisce uno spettro nutritivo più ampio e completo alle larve in allevamento. Tra le differenze riscontrabili nelle composizioni dei due prodotti impiegati nelle prove, si evidenzia in *Tetramin*® la presenza di lecitina (Tab.3.2).

Secondo quanto riportato da Sneller e Dadd (1981) la lecitina, integrata nella dieta, migliora la crescita larvale riducendo il tempo di impupamento. Questo additivo, ben tollerato dalle larve a tutte le concentrazioni testate, mostra scarso effetto sul peso delle pupe maschili e femminili, aumenta la longevità degli adulti e migliora la produttività di uova.

Prove di laboratorio sono in programma per valutare l'impiego di lecitina come additivo puro da impiegare nella dieta proposta alle larve e per chiarire con esattezza le sue possibilità di impiego.

Ulteriori prove sono necessarie per verificare i dosaggi della dieta al fine di ridurre la quantità di residuo alimentare nelle vasche di allevamento che potrebbe influenzare negativamente il regolare sviluppo larvale.

Tab.3.2 - Composizione dei due prodotti commerciali impiegati nella dieta

Friskies Adult – Purina®	TetraMin®
Carni e derivati	Pesci e sottoprodotti dei pesci,
Cereali	Cereali
Lieviti	Lieviti
Ortaggi (1%), Estratti di proteine vegetali	Alghe, Estratti di proteine vegetali
Oli e grassi,	Oli e grassi,
	Lecitina
Sostanze minerali	
Ca (1,3%) , P (1,2%), K (0,7%),	
Mg (0,12%), Cu (8 mg/kg)	
	Zuccheri
Metionina (0,6 %)	
vitamina A - 8500 U.I./kg	vitamina A - 37 600 U.I./kg
vitamina D3 - 850 U.I./kg	vitamina D3 - 2 000 U.I./kg
vitamina E - 75 mg/kg	vitamina E - 125 mg/kg
	vitamina C - 265 mg/kg
taurina - 1000 mg /kg	

3.1.2 - Prova ATP

In tabella 3.3 si riportano i dati ottenuti per la verifica dell'attività fagostimolante dell'ATP aggiunto al pasto di sangue. L'analisi statistica dei risultati (Tab.3.4) non evidenzia differenze significative in nessuno dei parametri considerati tra il campione nutrito con ATP e il testimone costituito da femmine con pasto di sangue senza ATP aggiunto.

Per quanto riguarda l'impiego di ATP è stato possibile osservare un incremento, statisticamente non significativo, del numero di femmine che effettuavano il pasto e del numero di uova prodotte sia a 6 che a 12 giorni (Tab.3.3).

Dai risultati emersi nella prova ATP abbiamo potuto osservare come la fecondità media della colonia di *Ae. albopictus* in allevamento presso il CAA abbia subito un significativo calo ($F=11,96$, $P=0,004239$) con una diminuzione della percentuale di uova deposte per femmina pari a circa il 28,8 %.

Studi precedenti relativi alla fecondità delle femmine in allevamento mostravano infatti una media di uova deposte per femmina pari a 74.2 ± 5.9 quando nutrite con sangue bovino.

Tale calo potrebbe essere ricondotto a una possibile infezione del ceppo già riscontrata in precedenti prove di densità sugli allevamenti larvali.

Risulta quindi necessario, per il proseguimento della sperimentazione, valutare la possibilità di integrare nella dieta delle larve sostanze antibiotiche che possano contrastare il pericolo di presenze infettive sempre probabili negli allevamenti intensivi di insetti.

Tab.3.3 - Prova ATP

50 femmine/gabbia

età 6 gg		n° femmine pasto		n° uova deposte		uova/femmina	
Gabbia	N	Media	DS	Media	DS	Media	DS
Test	3	12,33	5,51	561,67	290,64	45,57	8,02
ATP	3	19,67	4,93	852,33	221,51	43,26	0,66
All Grps	6	16,00	6,16	707,00	280,65	44,41	5,24

età 12 gg		n° femmine pasto		n° uova deposte		uova/femmina	
Gabbia	N	Media	DS	Media	DS	Media	DS
Test	3	28,00	8,54	1379,67	265,37	50,74	8,06
ATP	3	28,00	3,46	1551,33	401,09	54,91	8,47
All Grps	6	28,00	5,83	1465,50	318,37	52,83	7,74

Tab.3.4 - Analisi della varianza - Prova ATP

età 6 gg	SS	df	MS	SS	df	MS	F	p
n° femmine pasto	60,8	1,0	60,8	153,5	10,0	15,4	4,0	0,1
n° uova deposte	62496,3	1,0	62496,3	909243,3	10,0	90924,3	0,7	0,4
uova / femmina	36,6	1,0	36,6	1237,7	10,0	123,8	0,3	0,6

età 12 gg	SS	df	MS	SS	df	MS	F	p
n° femmine pasto	90,8	1,0	90,8	336,2	10,0	33,6	2,7	0,1
n° uova deposte	329014,1	1,0	329014,1	683566,2	10,0	68356,6	4,8	0,1
uova / femmina	4,3	1,0	4,3	779,3	10,0	77,9	0,1	0,8

Procedure e agenti sterilizzanti, antibiotici e inibitori utili per allevamenti massali di zanzare sono stati descritti da Greenberg (1969) e riassunti come segue.

Una soluzione 1:1000 di Roccal* può essere usata per inibire la formazione di muffe sulle strisce di carta con uova per la loro conservazione in frigorifero. Tale procedura può essere evitata qualora si intenda mantenere le uova per breve periodo prima del loro impiego. L'impiego di tipi di antibiotici è generalmente sconsigliata come additivo nella dieta larvale anche se Williams (1953) osservava una abbondante produzione larvale impiegando diete arricchite di tetramicina e streptomycin.

L'eliminazione di vorticellidi da larve di aedine raccolte dal campo è possibile dopo l'immersione del campione (al quarto stadio di sviluppo) in alcol 70% per 30-45 secondi. In questo modo è possibile raccogliere e allevare in sicurezza ceppi raccolti in campo.

Per mantenere una colonia sterilizzata, le uova possono essere disinfettate in ammonio quaternario.

I disinfettanti normalmente presenti nell'acqua di rubinetto (es. Cloro) possono risultare tossici per le larve mentre l'acqua distillata risulta priva di contaminanti chimici.

Tali indicazioni verranno prese integrate nelle procedure operative per la gestione dell'allevamento massale.

* Disinfettante per uso generico in laboratorio (Hyamine, Zephiran, Detergicide, e Surgi-Bac - 1% hexachlorophene), con azione mirata sulla permeabilità delle membrane batteriche.

3.2 - Prove di Sterilizzazione

3.2.1 - Prove di irraggiamento 78 80 85 Gy

In tabella 3.5 vengono riportati i dati registrati nelle prime prove di irraggiamento.

Sono state irraggiate complessivamente 650 pupe. Le pupe testimone sono state 150. Come riportato in tabella 3.5 i maschi irraggiati allo stadio pupale (età 5- 48h) evidenziano una sensibile diminuzione della fertilità rispetto al testimone non trattato (Tab.3.5 - Test Newmann Keuls). Le uova deposte da femmine accoppiate con maschi fertili schiudono al 79,8% mentre la fertilità residua media delle femmine accoppiatesi con maschi irraggiati risulta pari a 7,42%. Le analisi dei risultati ottenuti con le diverse dosi di irraggiamento mostrano però un ampio residuo di fertilità nei maschi trattati che sembra non mostrare relazione con l'intensità radioattiva fornita. si è andati ad investigare con prove mirate.

Tab. 3.5 - Prove di irraggiamento

50 maschi irraggiati (Gy) + 50 femmine vergini

Gy	n° repliche	uova deposte	larve	% schiusura	
0	3	3567	2826	79,8 ± 3,9	a
78	3	2361	147	6,6 ± 0,5	b
80	7	7360	302	3,9 ± 3,5	b
85	3	4799	628	12,4 ± 4,1	c

Ulteriori prove sono state eseguite sottoponendo le pupe maschio a dosi di 85 Gy a differenti ore dall'impupamento per la verifica della sensibilità in funzione dell'età di irraggiamento. I dati riportati in tabella 3.5 e 3.6 mostrano gli andamenti della mortalità e della fertilità residua osservata. Maschi di *Ae. albopictus* irraggiati a 85 Gy in età pupale inferiore a 14h mostrano mediamente una mortalità del 79,4% e una fertilità residua indotta sulle femmine del 6,15%. Pupe maschio irraggiate a 85 Gy in età superiore alle 14h mostrano una mortalità media del 9,13% inducendo piena sterilità nelle femmine.

I risultati ottenuti evidenziano come la maturità delle pupe influisca sia sulla mortalità delle pupe che sull'efficacia sterilizzante dell'irraggiamento (Tab.3.6 e 3.7). Come riportato anche da Wijeyaratne (1977) le pupe più vecchie mostrano una minore mortalità e una maggiore sensibilità alle radiazioni rispetto a quelle più giovani.

Tab. 3.6 - Mortalità (85 Gy)

50 maschi irraggiati (85 Gy) + 50 femmine vergini

età delle pupe	n°pupe irraggiate	pupe morte	adulti morti	Tot. morti	% mortalità	
2-7h	300	151	105	256	85,30%	a
2-14h	200	72	69	141	70,50%	a
7-22h	300	7	29	36	12,00%	b
>14h	200	6	8	14	7,00%	b
>22h	300	4	19	23	7,67%	b

Tab. 3.7 - Fertilità (85 Gy)*50 maschi irraggiati (85 Gy) + 50 femmine vergini*

età delle pupe	uova	larve	% schiusura	
2-7h	516	60	0,077 ± 0,091	a
2-14h	3271	173	0,053 ± 0,036	a
7-22h	2134	0	0,000 ± 0,000	b
>14h	1122	0	0,000 ± 0,000	b
>22h	3015	1	0,000 ± 0,001	b

Occorre quindi fare molta attenzione al momento in cui si sottopongono le pupe a irraggiamento affinché gli effetti radianti determinino un efficace effetto sterilizzante senza influire eccessivamente sulla perdita di fitness del campione irraggiato.

3.2.2 - Prove di irraggiamento 40 - 60 - 80 Gy su pupe maschio di età 16-24h, 24-40h e 40-48h

Si sono valutati gli effetti dell'età delle pupe irraggiate sulla fertilità residua e sulla sopravvivenza dei maschi irraggiati a 40, 60 e 80 Gy. Si è inoltre stimata la fecondità delle femmine accoppiate con maschi irraggiati a diverse dosi.

I dati registrati nel corso della prova sono riportati in tabella 3.8. Complessivamente sono state irraggiate 600 pupe, le pupe utilizzate come testimone erano 200. Le uova deposte da femmine accoppiate con maschi irraggiati e con maschi fertili (controllo) sono state rispettivamente 9672 e 3526.

Analisi fertilità residua

Si osservano differenze significative ($F=40,6674$; $p=0,00022$) nella percentuale di schiusura delle uova tra quelle deposte da femmine testimone accoppiatesi con maschi fertili (75,9%) rispetto alle uova deposte da femmine accoppiate con maschi sottoposti a radiazione (1,25%) (Tab. 3.8). Non si osservano invece differenze significative nella percentuale di schiusura delle uova tra le diverse intensità radioattive studiate a nessuna età pupale (Tab. 3.8).

La fertilità residua con radiazioni superiori a 60 Gy è risultata trascurabile per tutte e tre l'età pupali.

A 40 Gy la percentuale di uova schiuse è risultata bassa, variabile da $1,73 \pm 2,45\%$ (per femmine accoppiatesi con maschi irraggiati in età pupale di 16-24 hr) a $0,30 \pm 0,43\%$ (per femmine accoppiatesi con maschi irraggiati in età pupale di 40-48 hr).

Si osserva un residuo di fertilità che è da considerare accettabile in un'ottica applicativa per il rilascio di maschi sterili in campo.

Risulta anche opportuno valutare dosi di irraggiamento inferiori per ottenere un quadro più completo della relazione dose/effetto.

Tab. 3.8 - Fertilità residua in funzione dell'età delle pupe irraggiate a 40, 60 e 80 Gy

Età pupe	Dose (Gy)	N	n° uova deposte	n° larve schiate	Fertilità residua (% di schiusura)	
16-24 h	0	1	1151	1043	90,62% ± 0,00%	a
	40	2	1063	16	1,73% ± 2,45%	b
	60	1	513	0	0,00% ± 0,00%	b
	80	1	151	0	0,00% ± 0,00%	b
24-40 h	0	2	1776	1293	71,09% ± 11,26%	a
	40	2	1477	4	0,39% ± 0,55%	b
	60	1	1059	0	0,00% ± 0,00%	b
	80	1	723	0	0,00% ± 0,00%	b
40-48 h	0	1	599	425	70,95% ± 0,00%	a
	40	2	3185	11	0,30% ± 0,43%	b
	60	1	665	1	0,15% ± 0,00%	b
	80	1	836	0	0,00% ± 0,00%	b

Si è osservata una tendenza, non significativa dal punto di vista statistico, ad una diminuzione della fertilità residua nelle femmine accoppiate con maschi irraggiati in funzione dell'età pupale di irraggiamento dei maschi. Le pupe irradiate in età pupale 16-24 (1,73%) mostrano infatti un più alto residuo di fertilità che si riduce progressivamente a 24-40h (0,39%) e 40-48h (0,30%) (Tab. 3.8).

Analisi sopravvivenza

L'età di irraggiamento delle pupe sembra invece che possa incidere in modo significativo sulla longevità dei maschi sviluppati, infatti aumentando l'età delle pupe irraggiate le differenze rispetto al testimone nelle curve di sopravvivenza dei maschi in funzione della radiazione si riducono (Tab. 3.9).

Nelle pupe irraggiate a 16-24 ore di età (Fig.3.1a) le differenze nella sopravvivenza dei maschi si sono rivelate significative a tutte le intensità radioattive ($\chi^2 = 77,63174$, $df = 3$ e $p = 0,00000$).

A 24-40 ore ed a 30-40 h di età (Fig.3.1b e 3.1c) non sono state notate differenze significative tra il testimone e 40 Gy mentre sono state rilevate differenze significative con le intensità più elevate (24-40 hr $\chi^2 = 55,45274$, $df = 3$ e $p = 0,00000$; 40-48 hr: $\chi^2 = 33,54549$ $df = 3$ e $p = 0,00000$).

Analizzando i dati in funzione dell' intensità della radiazione (Tab.3.10) le differenze nelle curve di sopravvivenza alle diverse età di irraggiamento delle pupe aumentano con la dose radioattiva.

Nel testimone non si osservano differenze nella sopravvivenza ($\chi^2 = 1,127718$, $df = 2$ e $p = 0,56901$) quindi l'età della pupe non sembra incidere sulla manipolazione dell'insetto durante le operazioni di irraggiamento (Fig. 3.2 a).

A 40 Gy ($\chi^2 = 11,20748$, $df = 2$ e $p = 0,00369$) ed a 60 Gy ($\chi^2 = 15,34890$, $df = 2$ e $p = 0,00047$) non si osservano differenze significative tra le pupe di 24-40 ore e quelle di 40-48 h mentre le pupe più giovani (16-24 h) sembrano essere più sensibili all'irraggiamento (Fig. 3.2 b e 3.2c).

A 80 Gy ($\chi^2 = 31,79946$, $df = 2$ e $p = 0,00000$) si notano differenze nella sensibilità all'irraggiamento a tutte le età pupali (Fig. 3.2 d).

Con l'incremento dell'età delle pupe irraggiate aumenta la resistenza alle radiazioni, pertanto per ridurre gli effetti negativi delle radiazioni occorre irraggiare le pupe con una età più vicina possibile allo sfarfallamento.

Tab. 3.9 - Longevità dei maschi irraggiati a diverse età pupali e Long-Rank test in funzione dell'età pupale

Età pupe	Dose (Gy)	Longevità (gg)	N. uncsd	N. csd	N	Log-Rank test			
						0	40	60	80
16-24 h	0	22,98 ± 6,90	15	35	50	-----	2,71 **	5,08**	6,68**
	40	19,97 ± 8,27	54	46	100	-----	-----	3,46**	5,90**
	60	15,31 ± 7,07	41	9	50	-----	-----	-----	3,87**
	80	8,64 ± 7,36	44	6	50	-----	-----	-----	-----
24-40 h	0	22,29 ± 6,86	39	61	100	-----	0,60	2,50*	5,97**
	40	22,16 ± 7,62	33	67	100	-----	-----	3,08**	6,24**
	60	20,92 ± 7,30	32	18	50	-----	-----	-----	3,86**
	80	12,62 ± 7,86	42	8	50	-----	-----	-----	-----
40-48 h	0	23,40 ± 6,19	15	35	50	-----	0,22	2,61**	5,23**
	40	22,81 ± 7,08	31	69	100	-----	-----	2,92**	5,88**
	60	21,18 ± 7,56	29	21	50	-----	-----	-----	2,87**
	80	18,26 ± 7,90	43	7	50	-----	-----	-----	-----

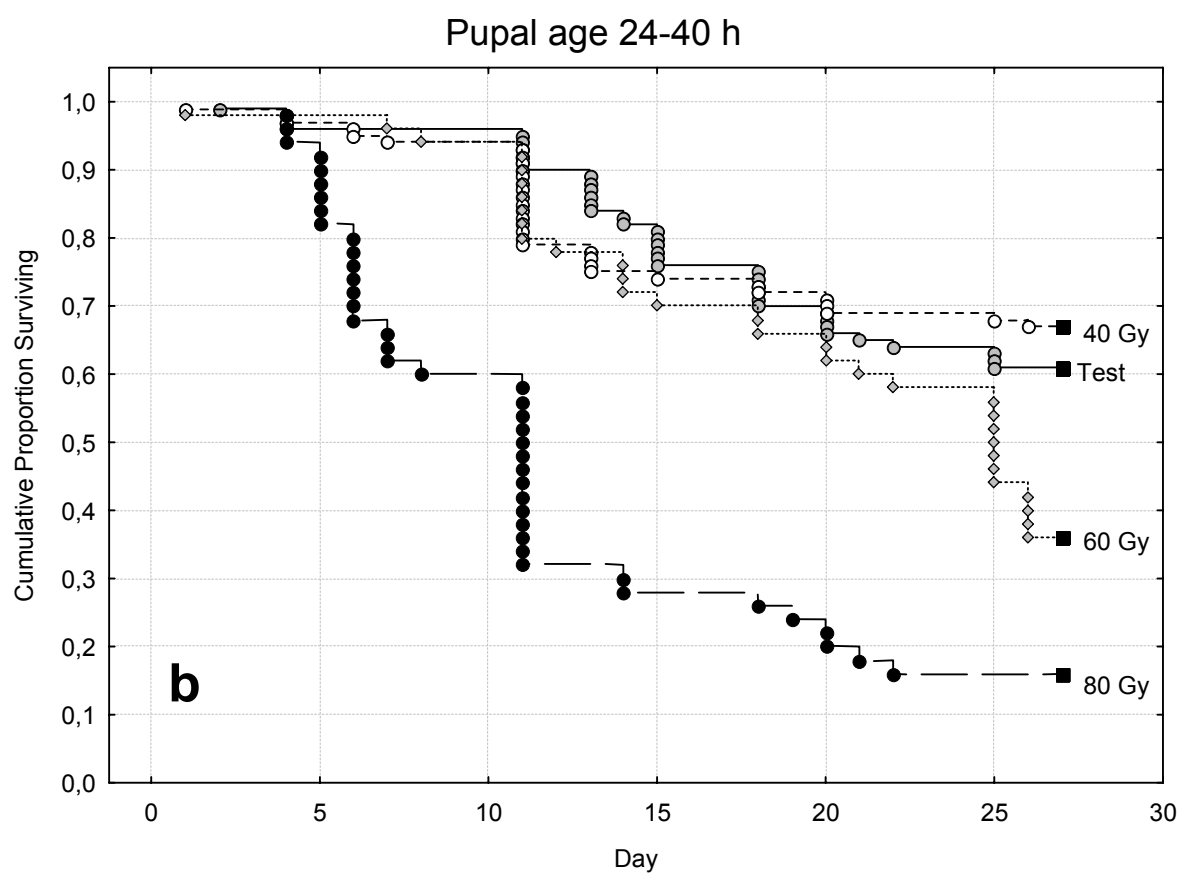
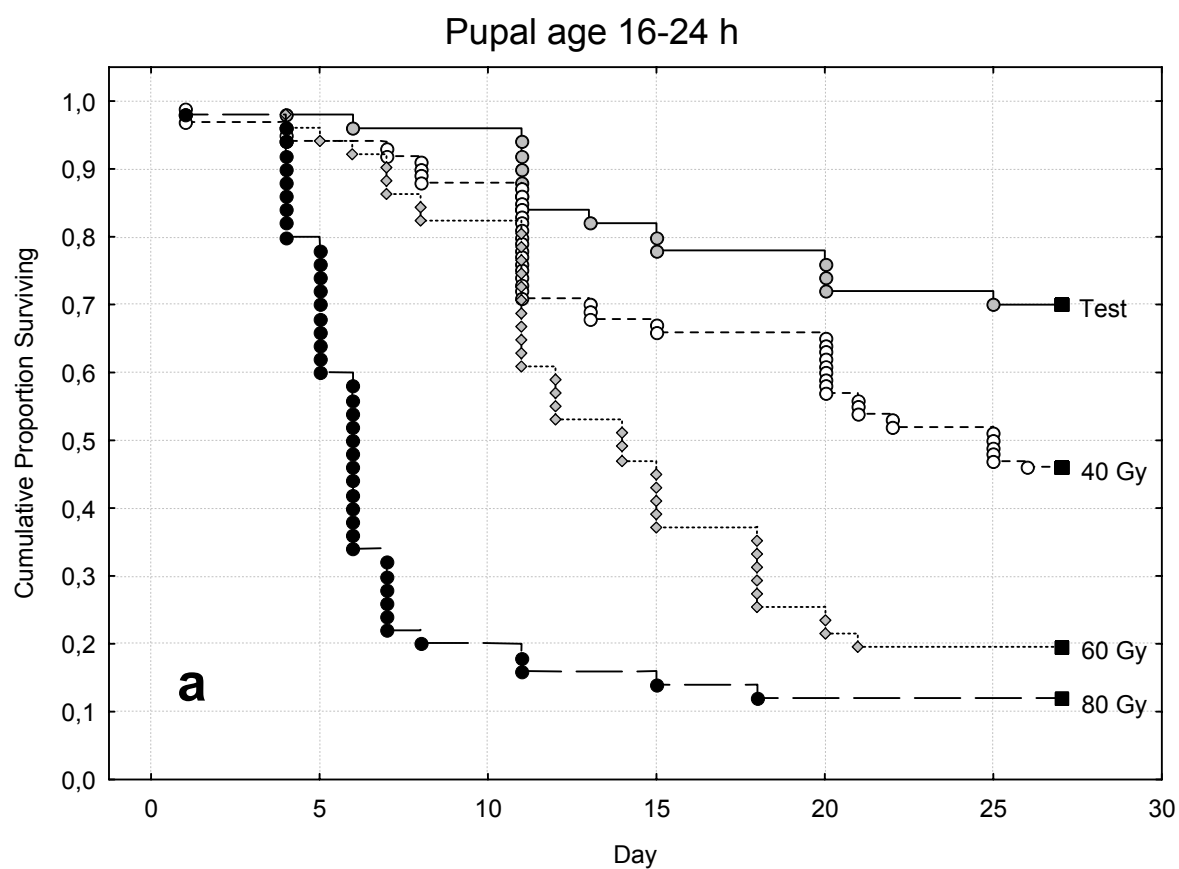
$p < 0,05$ ** $p < 0,01$

Tab. 3.10 - Long-Rank Test in funzione dell' intensità radioattiva per età pupale

Dose (Gy)	Età pupe	16-24 h	24-40h	40-48h
Test	16-24 h	-----	0,96	0,08
	24-40h	-----	-----	1,04
	40-48h	-----	-----	-----
40 Gy h	16-24 h	-----	2,81**	3,27**
	24-40h	-----	-----	0,39
	40-48h	-----	-----	-----
60 Gy	16-24 h	-----	2,93**	3,28**
	24-40h	-----	-----	0,50
	40-48h	-----	-----	-----
80 Gy	16-24 h	-----	2,62**	3,64**
	24-40h	-----	-----	2,08*
	40-48h	-----	-----	-----

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$

Fig. 3.1 - Cumulative Proportion Surviving dei maschi adulti irraggiati alle diverse età pupali (◻ Censored)



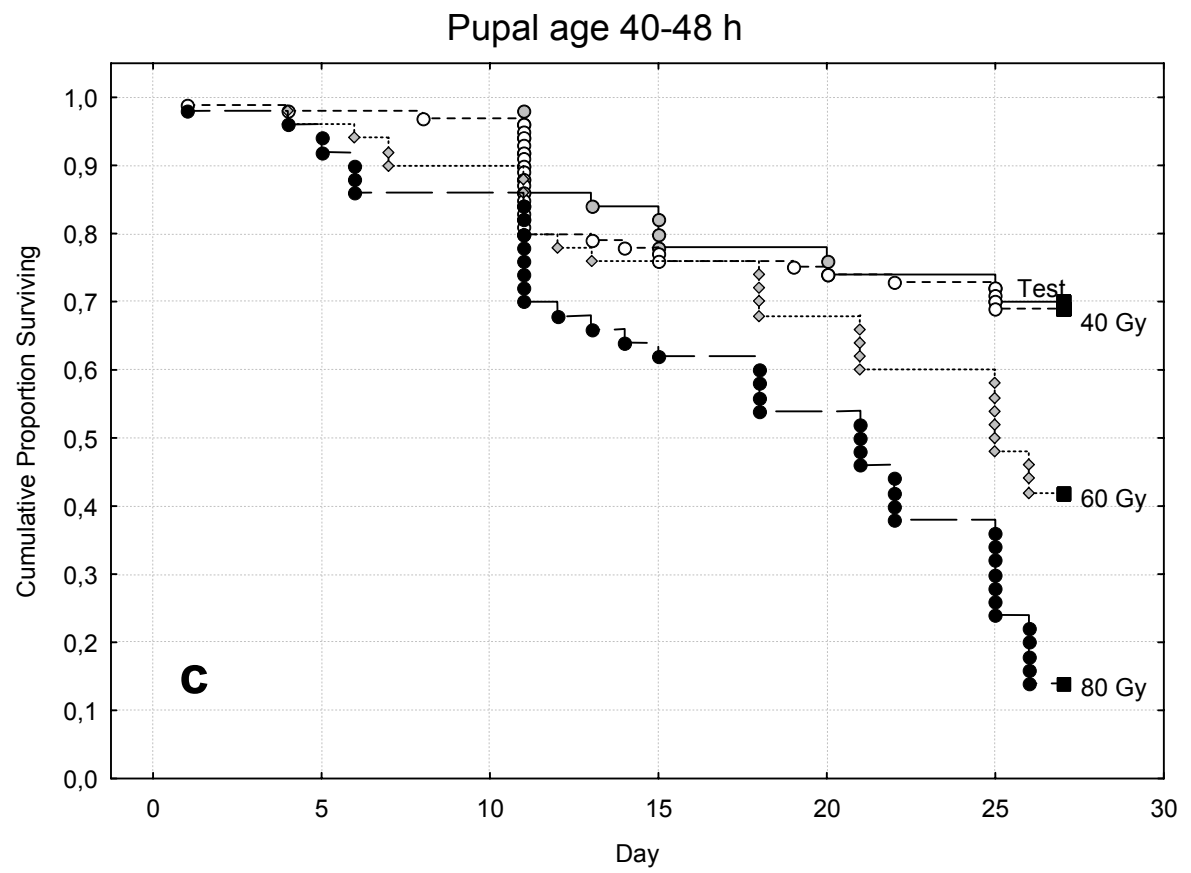
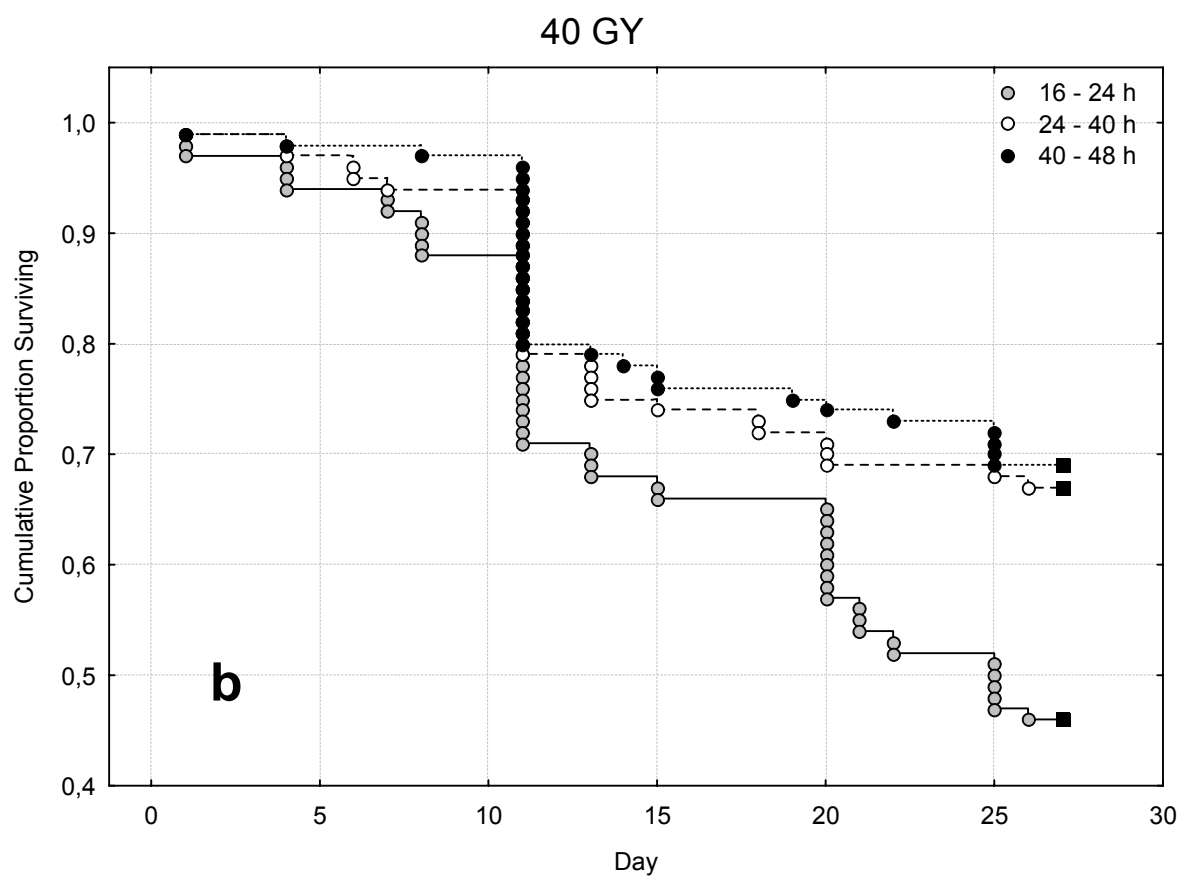
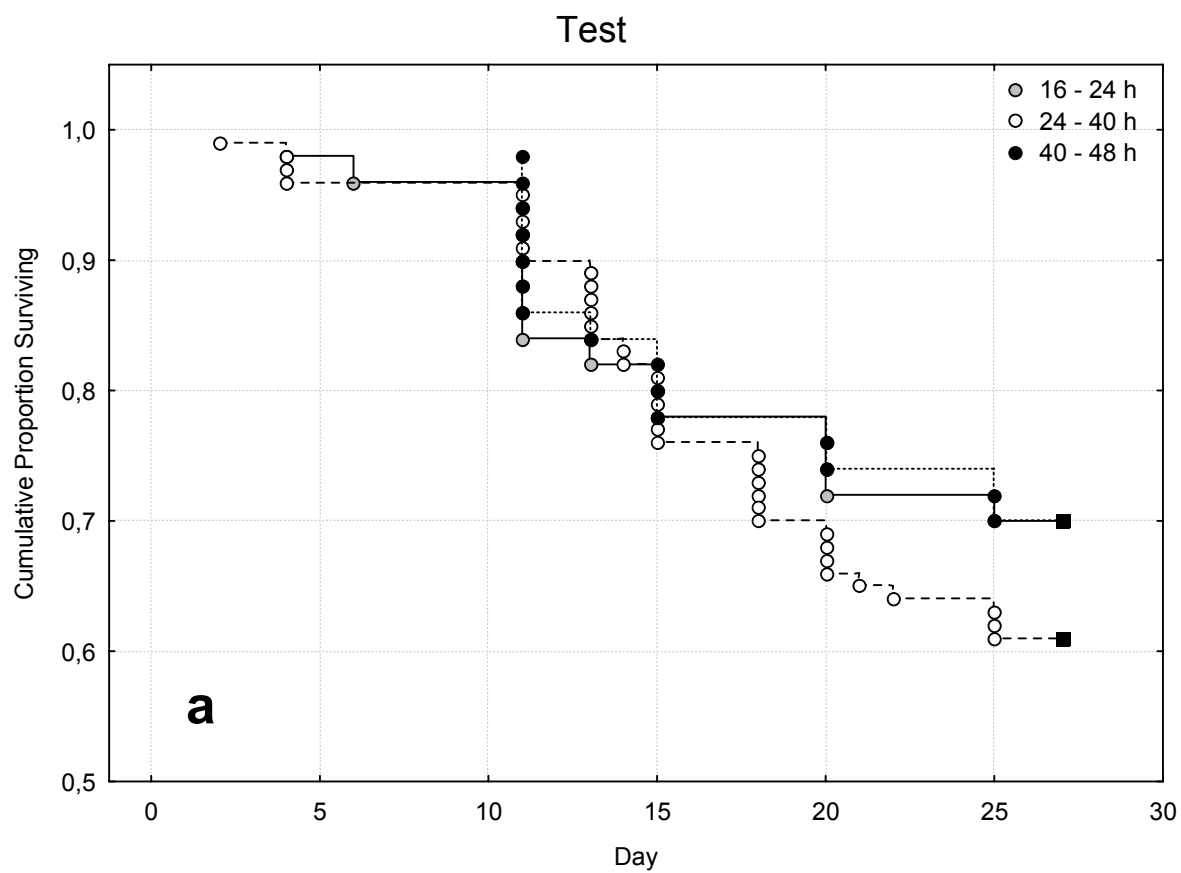
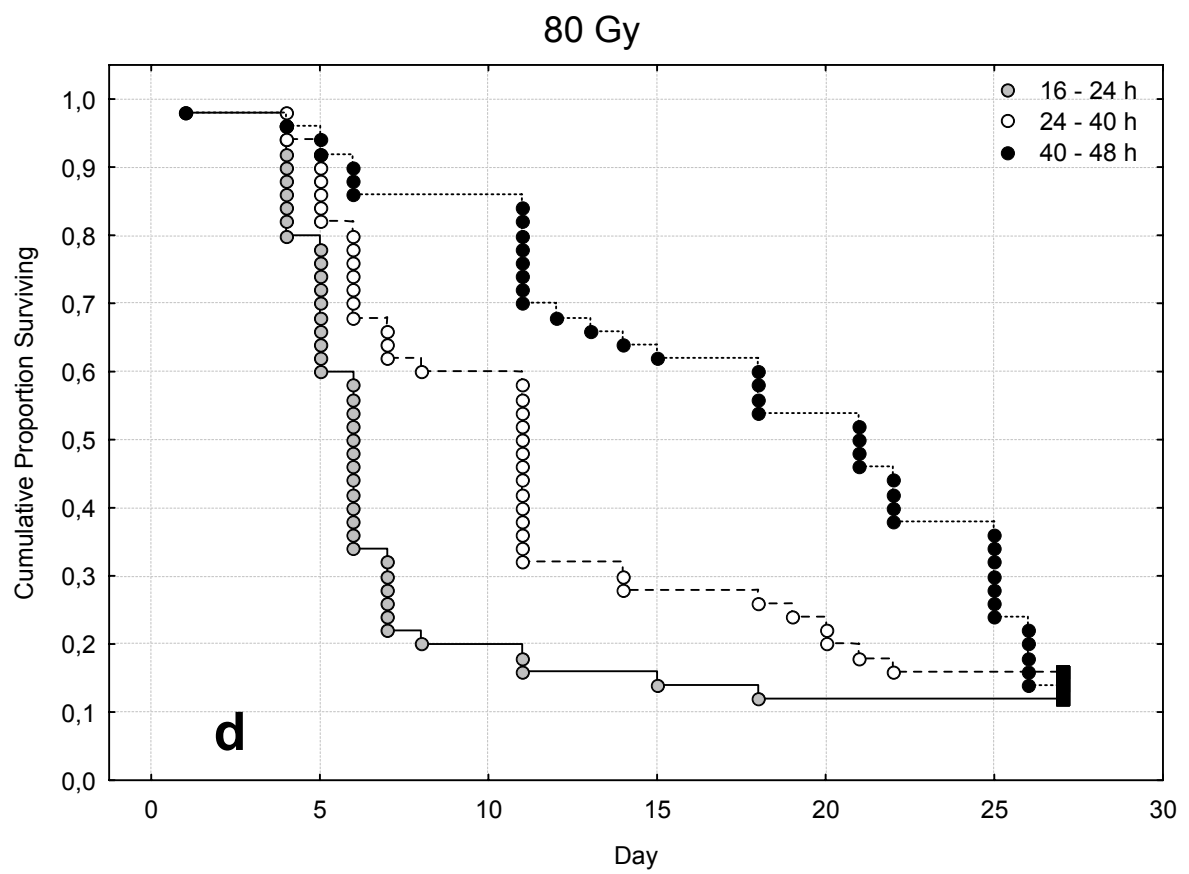
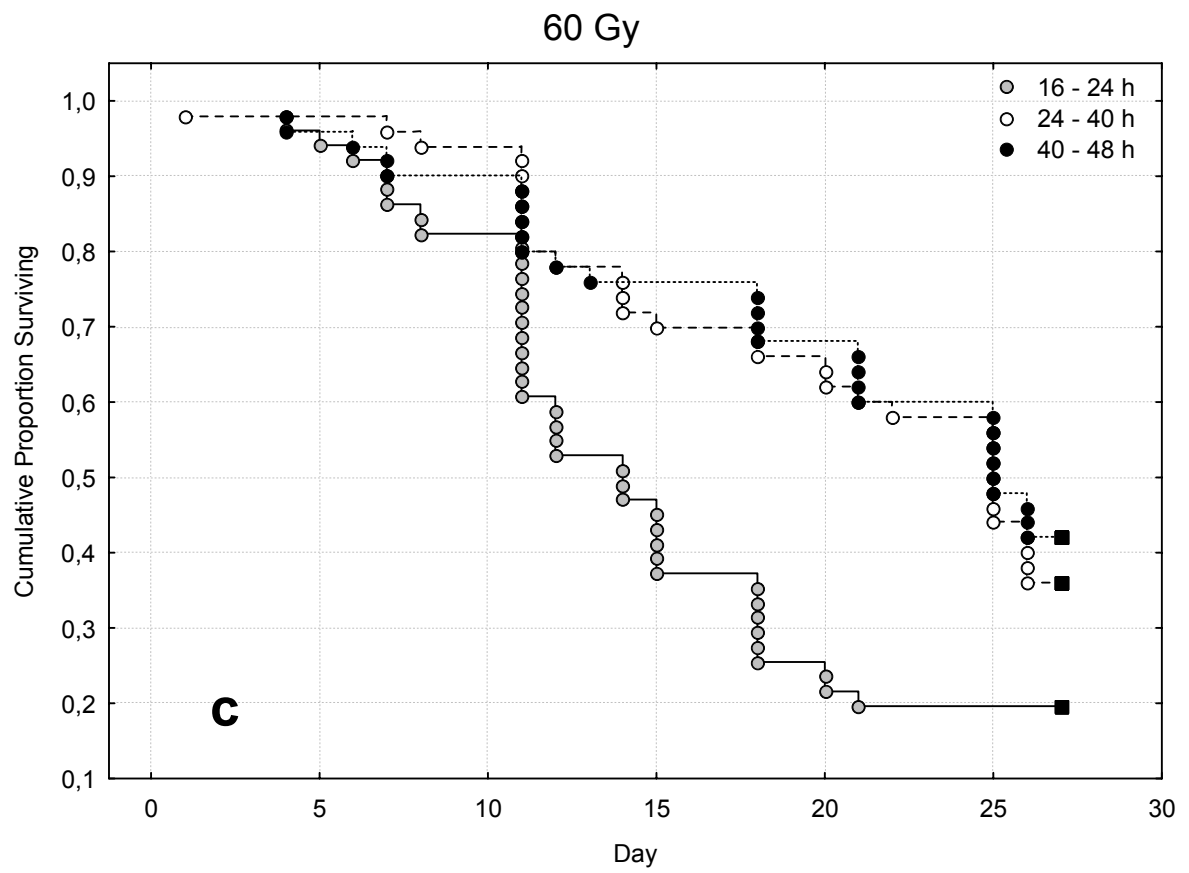


Fig. 3.2 - Cumulative Proportion Surviving dei maschi adulti irraggiati alle diverse dosi (□ Censored)





3.2.3 - Prova di irraggiamento a 20, 30, 40 e 50 Gy su pupe maschio di età 16-30h e 30-40h

Sono state condotte analisi di fecondità, sopravvivenza e fertilità degli adulti in funzione dei diversi ceppi impiegati nelle prove e delle differenti età pupali di irraggiamento dei maschi.

Analisi di fecondità

Le analisi di fecondità sono state valutate attraverso l'osservazione del parametro n°uova deposte per femmina. I 3 diversi ceppi di *Ae. albopictus* impiegati in questa prova (Rimini, Pinerolo e Cesena) non presentano differenze nella fecondità delle femmine ($F=0,004$ and $P=0,99$). In media le femmine di *Ae. albopictus* accoppiate con maschi fertili dello stesso ceppo depongono in laboratorio circa 66 uova con un minimo di 23,91 ed un massimo di 85 uova. In Tab.3.11 vengono riportati i dati di fecondità registrati in funzione dei tre ceppi impiegati (Testimone non irraggiato).

Tab. 3.11 - Fecondità dei ceppi di allevamento esaminati (Testimone non irraggiato)

Ceppo	N.	Media	DS	Min	Max
Rimini	6	65,96	21,51	23,91	85,00
Pinerolo	2	65,38	18,03	52,63	78,13
Cesena	3	64,82	10,61	58,61	77,08
All Grps	11	65,54	16,93	23,91	85,00

In tabella 3.12 si osservano i dati relativi alla fecondità registrata durante le prove di irraggiamento per i ceppi impiegati.

Tab. 3.12 - Dati di fecondità per i diversi ceppi impiegati nella prova.

Ceppo	Rad	N	Media	DS	Min	Max
Rimini	0	2	48,38	34,60	23,91	72,84
	20	2	91,28	11,31	83,29	99,28
	30	2	74,36	36,92	48,25	100,46
	40	2	73,35	18,81	60,05	86,64
	50	2	57,47	2,08	56,00	58,95
Pinerolo	0	2	65,38	18,03	52,63	78,13
	20	2	61,56	17,43	49,24	73,88
	30	2	49,10	6,63	44,41	53,79
	40	2	64,23	5,11	60,62	67,85
	50	2	59,55	4,01	56,71	62,38
Cesena	0	3	64,82	10,61	58,61	77,08
	20	2	82,08	2,86	80,06	84,11
	30	2	75,81	28,78	55,46	96,15
	40	2	61,66	10,00	54,59	68,73
	50	2	66,98	14,94	56,42	77,54
All Groups		31	66,35	17,21	23,91	100,46

Non si osservano differenze significative (Tab.3.13) tra la fecondità delle femmine (n°uova/femmina) accoppiate con maschi irraggiati a differenti intensità radioattive in funzione dei 3 diversi ceppi impiegati (Fig. 3.3).

Tab. 3.13 - ANOVA a 2 vie - Effetto del ceppo impiegato sulla fecondità (Rimini, Cesena e Pinerolo)

	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	106559,1	1	106559,1	305,8181	0,000000
Ceppo	220,9	1	220,9	0,6339	0,437600
Rad	1169,7	4	292,4	0,8392	0,520214
Ceppo*Rad	2156,8	4	539,2	1,5475	0,236117
Error	5575,0	16	348,4		

L'analisi della fecondità non evidenzia differenze significative (Tab.3.14) nemmeno analizzando i dati in funzione delle diverse età pupali impiegate nelle prove (Fig. 3.4). In Tab.3.15 si osservano i dati relativi alla fecondità registrata durante le prove di irraggiamento per le età testate.

Tab. 3.14 - ANOVA a 2 vie - Effetto dell'età delle pupe sulla fecondità (16-30h ; 30-40h)

	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	135273,8	1	135273,8	420,6304	0,000000
Ceppo	640,3	2	320,2	0,9955	0,391290
Rad	1322,8	4	330,7	1,0283	0,422719
Ceppo*Rad	1824,1	8	228,0	0,7090	0,680578
Error	5145,6	16	321,6		

Tab. 3.15 - Dati di fecondità per le diverse età irraggiate

Età pupe	Rad	N.	Media	DS	Min	Max
30-40 hr	0	4	74,75	7,92	68,48	85,00
	20	3	65,95	18,28	45,00	78,65
	30	3	58,34	24,36	30,69	76,63
	40	3	56,98	12,55	46,05	70,69
	50	3	58,78	9,25	52,73	69,43
16-30 hr	0	2	48,38	34,60	23,91	72,84
	20	2	91,28	11,31	83,29	99,28
	30	2	74,36	36,92	48,25	100,46
	40	2	73,35	18,81	60,05	86,64
	50	2	57,47	2,08	56,00	58,95
All Groups		26	65,72	18,71	23,91	100,46

Fig. 3.3 - Andamento delle fecondità per i diversi ceppi impiegati (Rimini, Pinerolo e Cesena)

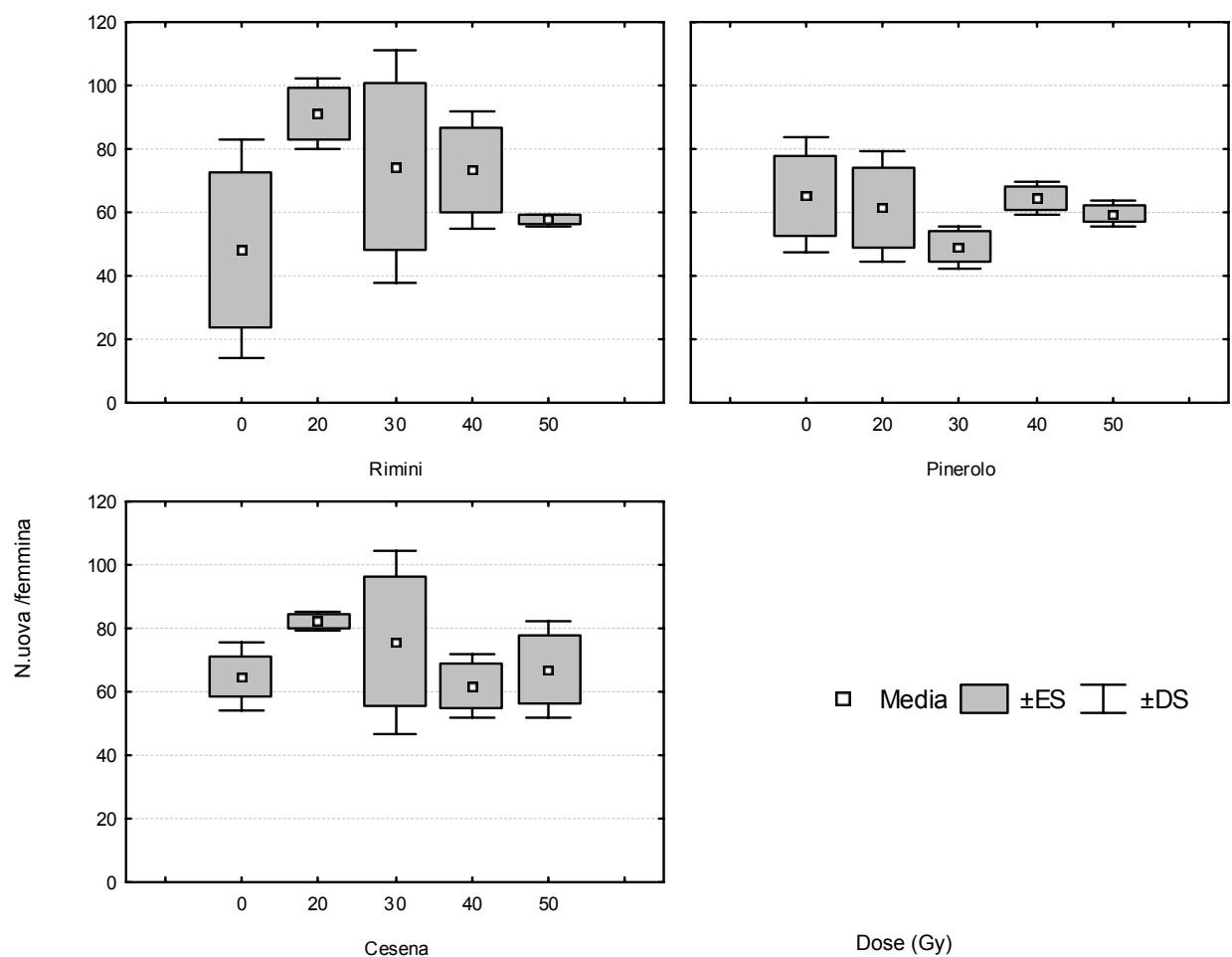
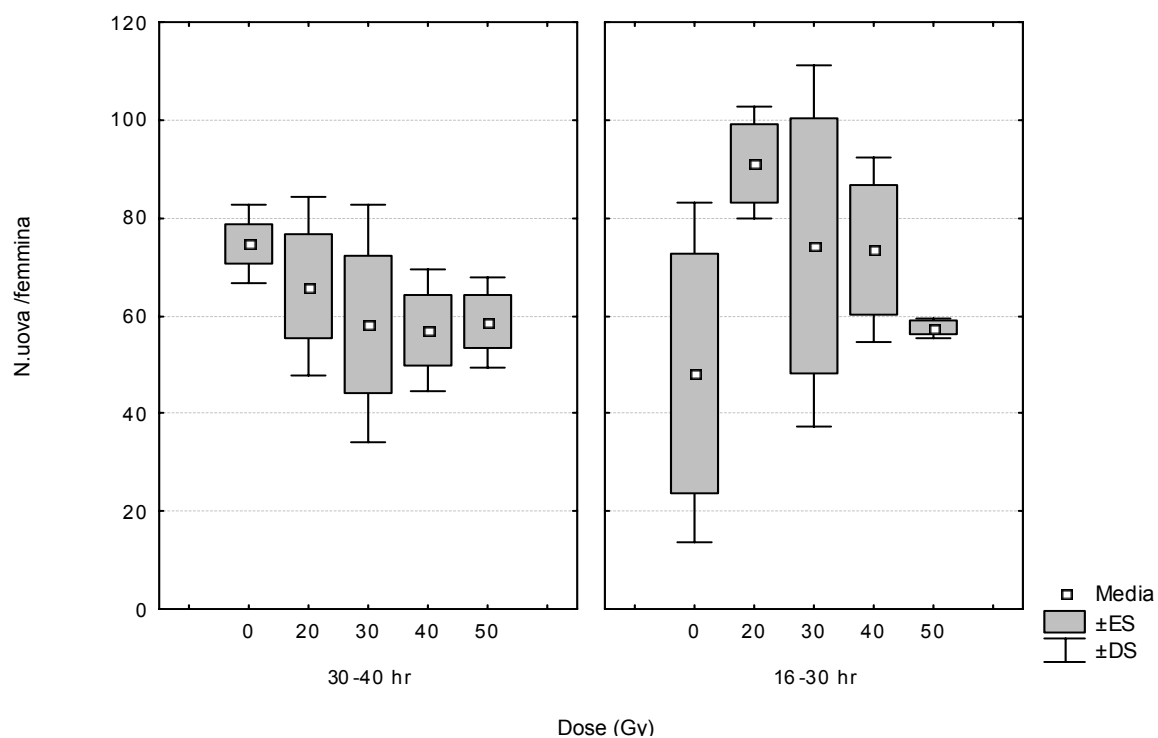


Fig. 3.4 - Andamento delle fecondità per le diverse età pupali impiegate (16-30h ; 30-40h)



Analisi della sopravvivenza (16-30h)

L'analisi di longevità dei testimoni non irraggiati (16-30h) per i diversi ceppi impiegati mostra differenze significative (Tab.3.16). In particolare il ceppo di Cesena (**C**) mostra una sopravvivenza significativamente inferiore. Non si osservano invece differenze significative tra il ceppo di Pinerolo e Rimini (**P, R**).

Tab. 3.16 - Analisi di longevità dei testimoni non irraggiati (16-30h) per i diversi ceppi impiegati.

Ceppo	Median	Mean	Std.Dv.	No.uncsd	N.censrd	Total N	Log-Rank Test		
							PIN	RIM	CES
Pinerolo	29,00	26,93	5,66	25	75	100	-----	1,38	2,40*
Rimini	28,00	27,79	4,98	17	83	100	-----	-----	3,46**
Cesena	26,00	23,40	7,79	54	96	150	-----	-----	-----
Total	28,00	25,66	6,78	96	254	350			

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

L'analisi dell'effetto della dose di irraggiamento su pupe di 16-30h sulla sopravvivenza dei maschi adulti è descritto in Tab.3.17. Si osservano differenze significative tra la longevità del testimone non irraggiato e dei maschi irraggiati a 30, 40, 50 Gy (Tab.3.17). In figura 3.5 si osserva l'andamento della longevità dei maschi irraggiati a 16-30h in funzione della dose ricevuta.

Tab. 3.17 - Analisi dell'effetto della dose di irraggiamento su pupe di 16-30h sulla sopravvivenza

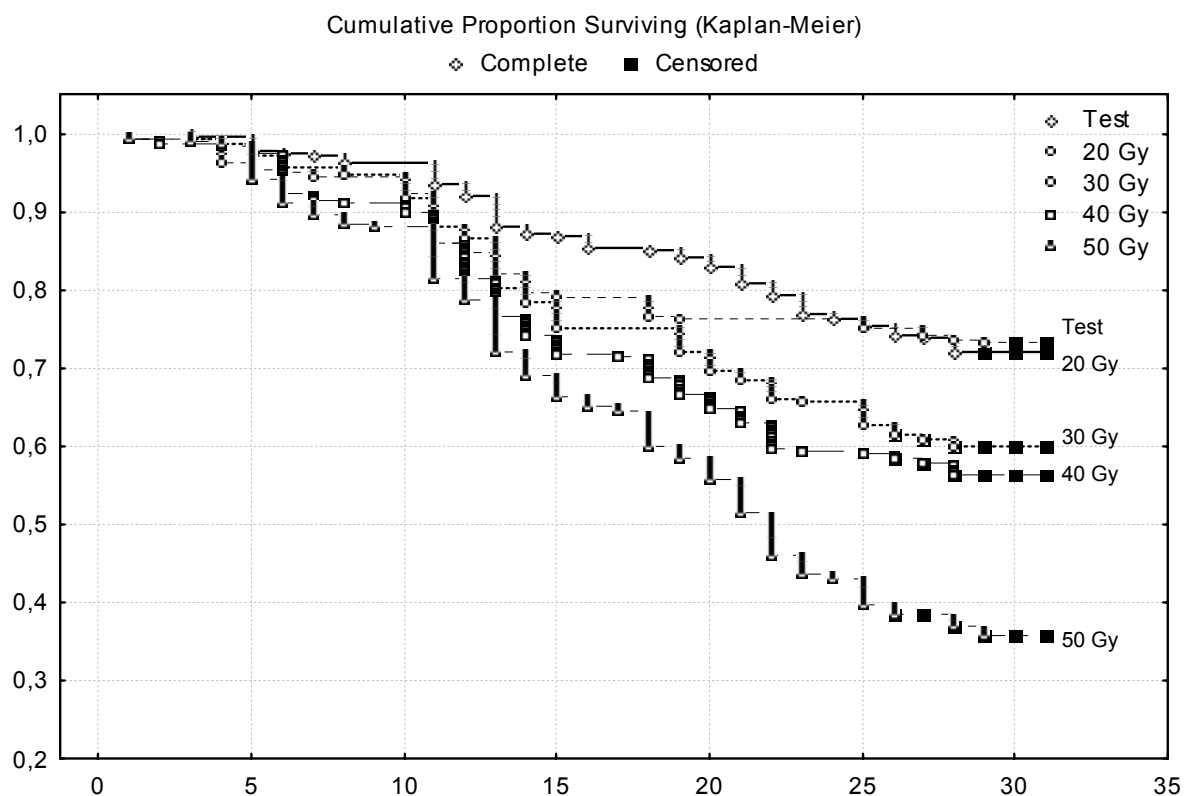
Dose (Gy)	Median	Mean	Std.Dv.	N.uncsd	N.csd	N	Log-Rank Test				
							0	20	30	40	50
0	28,00	25,66	6,782	96	254	350	-----	0,40	3,48**	4,56**	9,29**
20	30,00	25,81	8,676	80	220	300	-----	-----	3,09**	4,07**	8,42**
30	27,00	23,33	7,805	119	181	300	-----	-----	-----	1,10	5,57**
40	27,00	22,41	8,478	130	170	300	-----	-----	-----	-----	4,37**
50	22,00	20,31	8,318	190	110	300	-----	-----	-----	-----	-----
Total	27,00	23,57	8,257	615	935	1550					

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

In tabella 3.18 si riportano i valori medi di longevità per i diversi ceppi impiegati alle differenti dosi.

L'andamento della longevità conferma il ceppo di Cesena come il meno longevo dei tre impiegati, in accordo con il dato evidenziato sulla analisi di sopravvivenza dei testimoni a 16-30h (Tab.3.16). i ceppi di Rimini e Pinerolo mostrano sopravvivenza simile a tutte le dosi superiori 20 Gy. Il Long-Rank Test è stato impiegato per la misura delle differenze di sopravvivenza. In figura 3.6 si possono osservare gli andamenti della longevità dei maschi dei diversi ceppi in funzione della dose ricevuta.

Fig. 3.5 - Andamento della longevità dei maschi in funzione della dose ricevuta (16-30h).

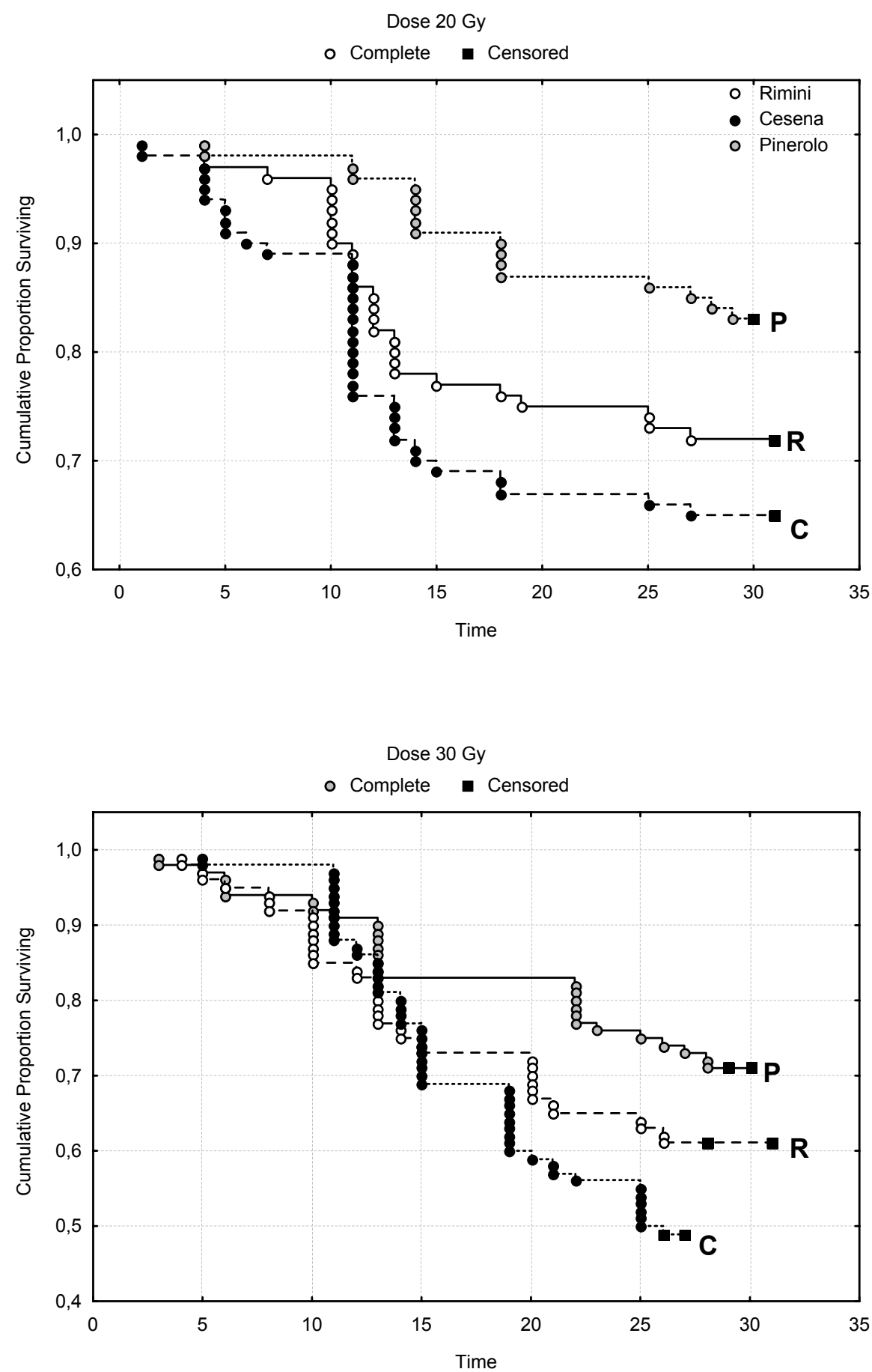


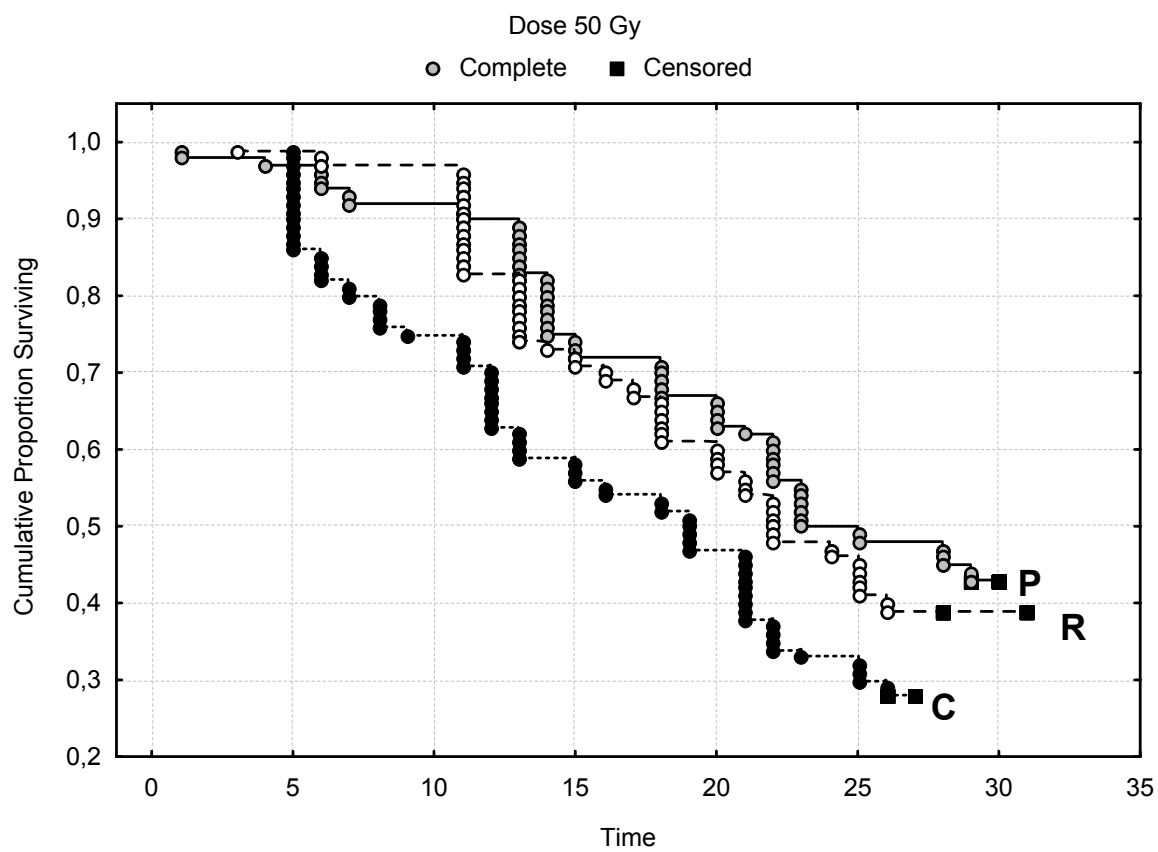
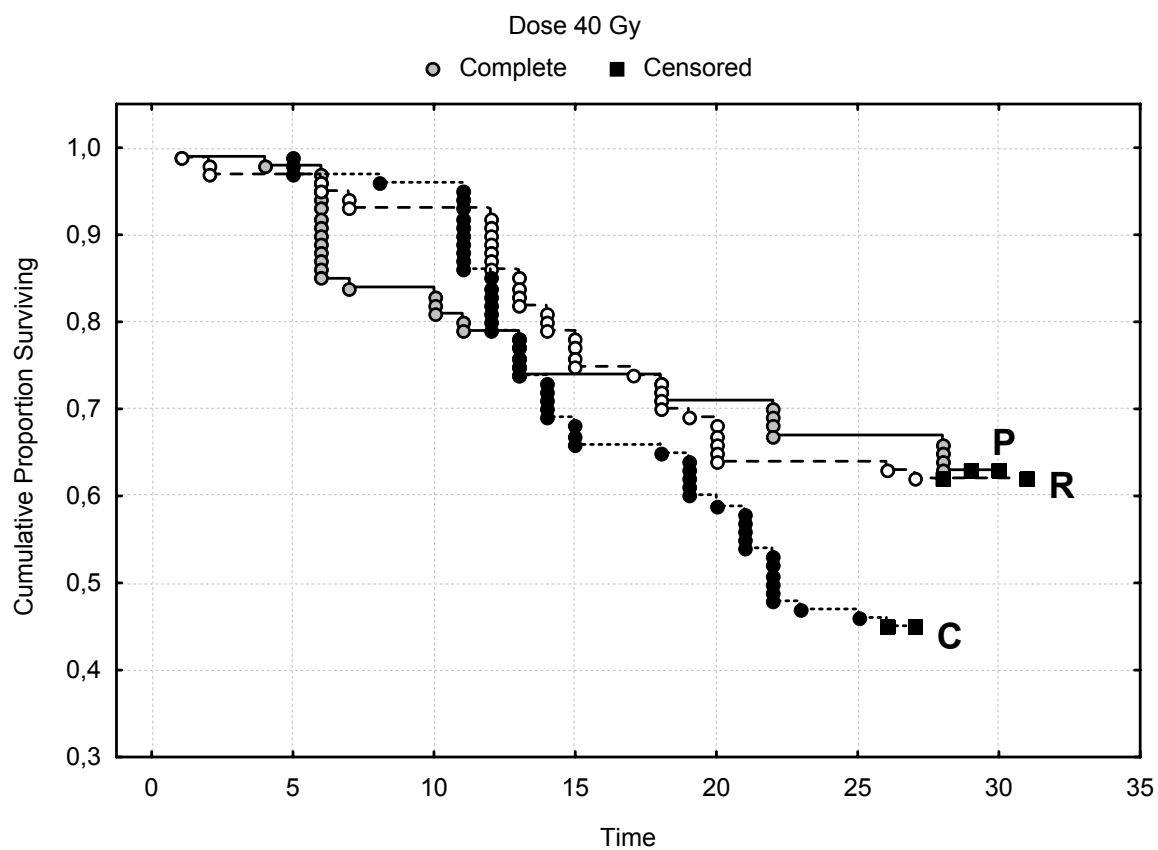
Tab. 3.18 - Longevità dei diversi ceppi impiegati (RIM, PIN e CES) in funzione della dose ricevuta

Dose	Ceppo	Median	Mean	Std.Dv.	N. uncsd	N. csd	N	Log-Rank Test		
								PIN	RIM	CES
20	PIN	30,000	27,710	5,899	17	83	100	-----	2,03*	3,13**
	RIM	31,000	25,840	8,844	28	72	100	-----	-----	1,13
	CES	31,000	23,870	10,338	35	65	100	-----	-----	-----
	Total	30,000	25,807	8,676	80	220	300			
30	PIN	29,000	25,560	7,674	29	71	100	-----	1,62	3,31**
	RIM	28,000	23,280	8,568	39	61	100	-----	-----	1,36
	CES	25,500	21,160	6,471	51	49	100	-----	-----	-----
	Total	27,000	23,333	7,805	119	181	300			
40	PIN	29,000	23,290	9,600	37	63	100	-----	0,02	2,49*
	RIM	28,000	23,560	8,476	38	62	100	-----	-----	2,25*
	CES	22,000	20,370	6,838	55	45	100	-----	-----	-----
	Total	27,000	22,407	8,478	130	170	300			
50	PIN	24,000	22,280	8,176	57	43	100	-----	0,84	3,26**
	RIM	22,000	21,410	7,670	61	39	100	-----	-----	2,26*
	CES	19,000	17,230	8,281	72	28	100	-----	-----	-----
	Total	22,000	20,307	8,318	190	110	300			

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$

Fig. 3.6 - Andamento della longevità dei maschi dei diversi ceppi in funzione della dose ricevuta.





Analisi sopravvivenza (16-30h vs. 30-40h)

Le analisi di longevità dei maschi irraggiati a 16-30h e 30-40h (Ceppo di Rimini) hanno evidenziato una relazione tra l'età di irraggiamento delle pupe e la sopravvivenza dei maschi adulti.

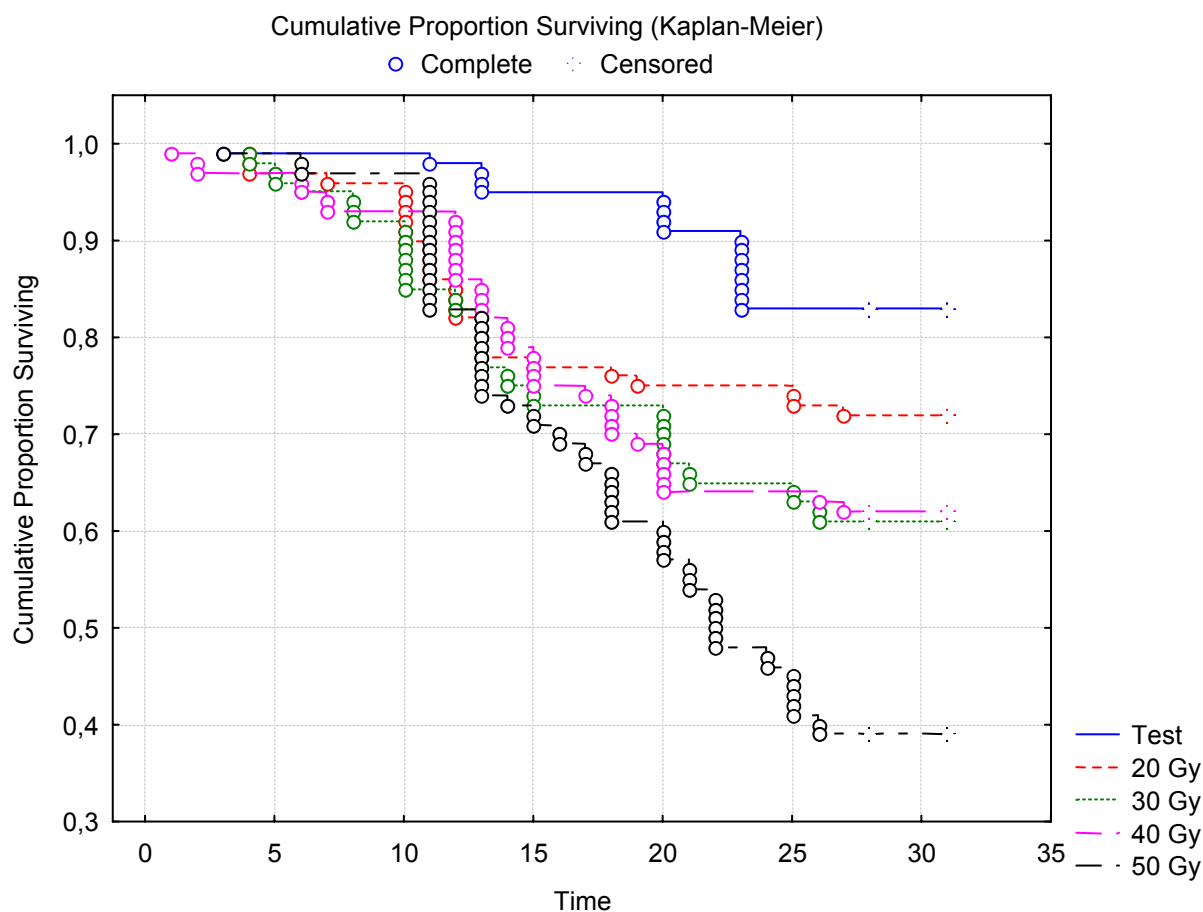
I maschi adulti irraggiati in età pupale 16-30h mostrano una longevità statisticamente inferiore al testimone a partire dalla dose di 20 Gy. e per tutte le altre dosi testate. A 50Gy i maschi mostrano inoltre una longevità significativamente inferiore al testimone e a tutte le altre dosi impiegate (Tab.3.19, Fig.3.7).

Tab. 3.19 - Analisi dell'effetto della dose di irraggiamento su pupe di 16-30h sulla sopravvivenza (Rimini)

Dose (Gy)	Median	Mean	Std.Dv.	N. uncscd	N. csd	N	Log-Rank Test				
							0	20	30	40	50
0	28,00	27,79	4,98	17	83	100	-----	2,10*	3,69**	3,58**	6,51**
20	31,00	25,84	8,84	28	72	100	-----	-----	1,52	1,27	4,12**
30	28,00	23,28	8,57	39	61	100	-----	-----	-----	0,18	2,61**
40	28,00	23,56	8,48	38	62	100	-----	-----	-----	-----	2,84**
50	22,00	21,41	7,67	61	39	100	-----	-----	-----	-----	-----
Total	28,00	24,38	8,11	183	317	500					

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$

Fig. 3.7 - Andamento della longevità dei maschi (16-30h) in funzione della dose ricevuta (Rimini)

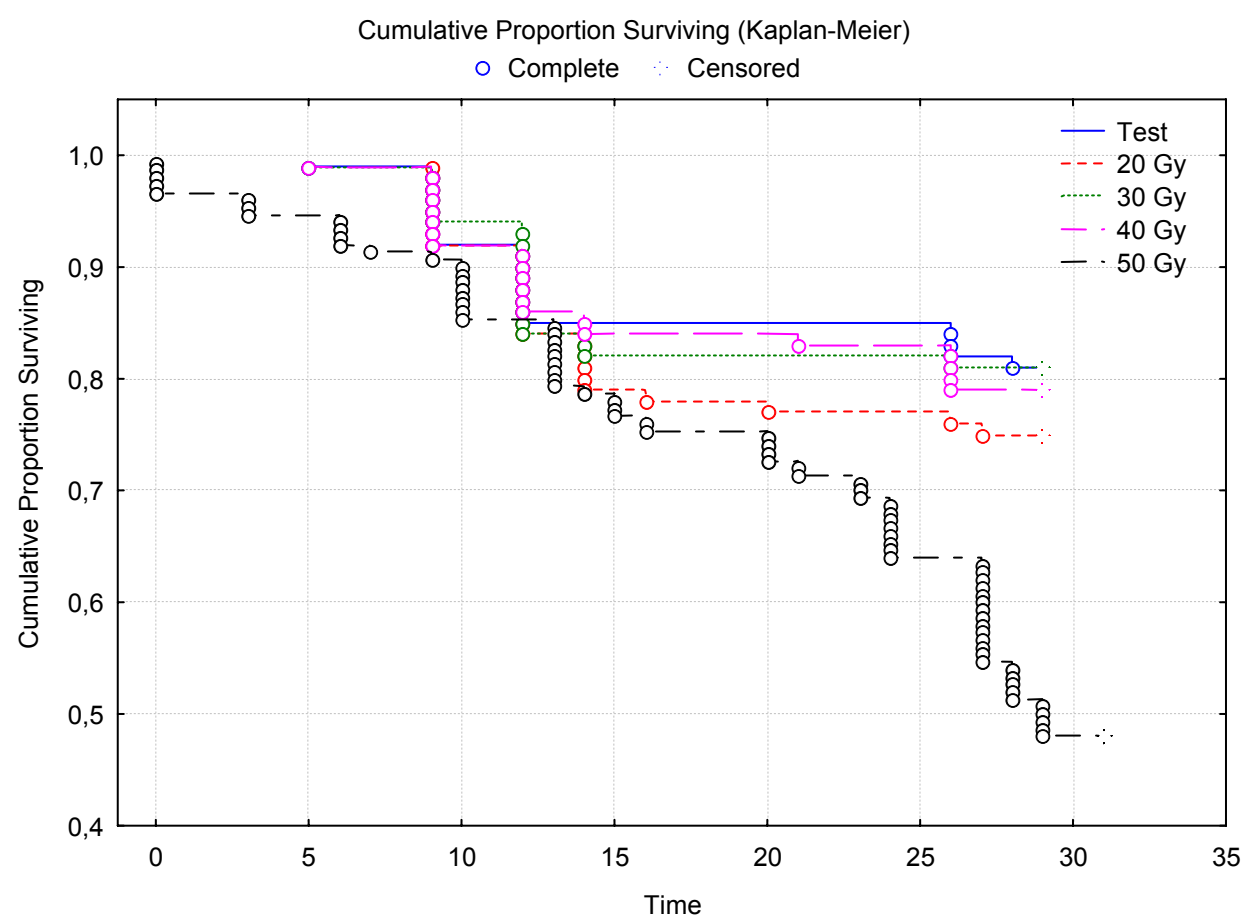


Le pupe irraggiate a 30-40h di età mostrano invece una longevità statisticamente inferiore al testimone solo a 50 Gy. Non si osservano differenze significative tra la longevità dei campioni irraggiati a 20, 30 e 40Gy e il testimone. (Tab.3.20, Fig. 3.8)

Tab. 3.20 - Analisi dell'effetto della dose di irraggiamento su pupe di 30-40h sulla sopravvivenza (Rimini)

Dose (Gy)	Median	Mean	Std.Dv.	N. uncsd	N. csd	N	Log-Rank Test				
							0	20	30	40	50
0	29,00	26,07	6,79	19	81	100	-----	0,98	0,02	0,34	4,90**
20	29,00	25,02	7,33	25	75	100	-----	-----	0,97	0,65	3,81**
30	29,00	25,73	7,00	19	81	100	-----	-----	-----	0,34	4,82**
40	29,00	25,84	6,86	21	79	100	-----	-----	-----	-----	4,54**
50	29,00	24,10	9,37	78	72	150	-----	-----	-----	-----	-----
Total	29,00	25,24	7,73	162	388	550					

Fig. 3.8 - Andamento della longevità dei maschi (30-40h) in funzione della dose ricevuta (Rimini)



Analisi della fertilità

La misura della fertilità è avvenuta attraverso l'analisi della percentuale di schiusura delle uova deposte dalle femmine accoppiatesi con i diversi maschi.

I dati ottenuti sono descritti in tabella 3.21.

Tab. 3.21 - Dati della fertilità residua calcolata nelle prove 20, 30, 40 e 50Gy sui ceppi RIM PIN CES

Età	Ceppo	Rad	N	N.uova deposte		N.larve schiuse		% schiusura	
				Media	DS	Media	DS	Media	DS
30-40 h	Rimini	0	4	2076,00	241,52	1751,70	227,14	84,32%	3,26%
		20	3	1328,67	410,28	121,20	36,14	9,33%	1,82%
		30	3	1361,00	474,54	12,80	6,61	0,94%	0,27%
		40	3	1265,67	506,55	3,20	2,50	0,23%	0,09%
		50	3	1502,33	392,83	0,67	0,58	0,05%	0,04%
16-30 h	Rimini	0	2	955,00	606,70	800,00	486,49	84,68%	2,85%
		20	2	1768,00	26,87	97,50	7,78	5,51%	0,36%
		30	2	1692,00	1301,08	14,00	0,00	1,17%	0,90%
		40	2	1843,50	823,78	3,50	2,12	0,18%	0,03%
		50	2	1176,00	79,20	0,00	0,00	0,00%	0,00%
16-30 h	Pinerolo	0	2	1648,00	321,03	1320,60	228,25	80,31%	1,79%
		20	2	1046,50	296,28	44,00	11,31	4,22%	0,11%
		30	2	1130,50	531,04	27,80	18,10	2,34%	0,50%
		40	2	1077,50	276,48	4,90	6,93	0,38%	0,54%
		50	2	1208,00	585,48	1,40	1,98	0,09%	0,12%
16-30 h	Cesena	0	3	1155,33	430,02	948,73	405,09	81,03%	4,85%
		20	2	1519,50	111,02	68,50	0,71	4,52%	0,28%
		30	2	1290,50	57,28	5,60	3,96	0,43%	0,29%
		40	2	1357,50	607,40	0,00	0,00	0,00%	0,00%
		50	2	1685,00	468,10	0,70	0,99	0,03%	0,05%

In Fig. 3.9 viene riportata la curva di Dose Radiazione / Fertilità residua calcolata per i diversi ceppi in esame mentre in Fig. 3.10 la medesima curva è considerata in rapporto all'età di irraggiamento 16-30h e 30-40h delle pupe per il ceppo di Rimini.

I valori riportati sono stati corretti con Abbott in rapporto al testimone.

Fig. 3.9 - Curve Dose Radiazione / Fertilità Residua - Corretta Con Abbott (Ceppi)

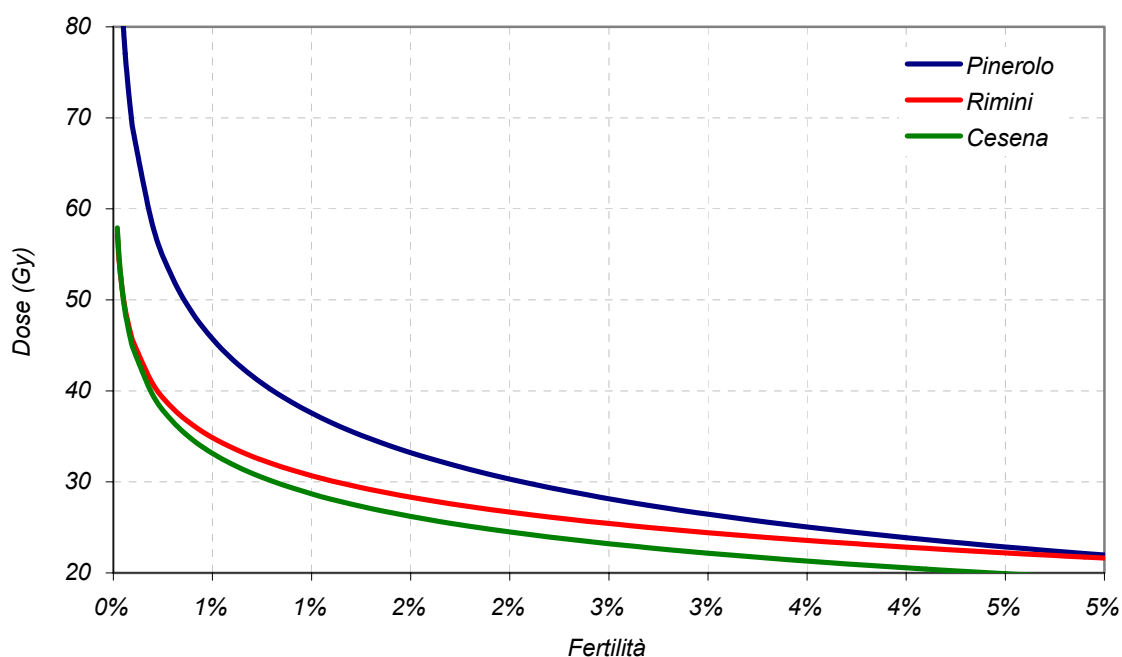
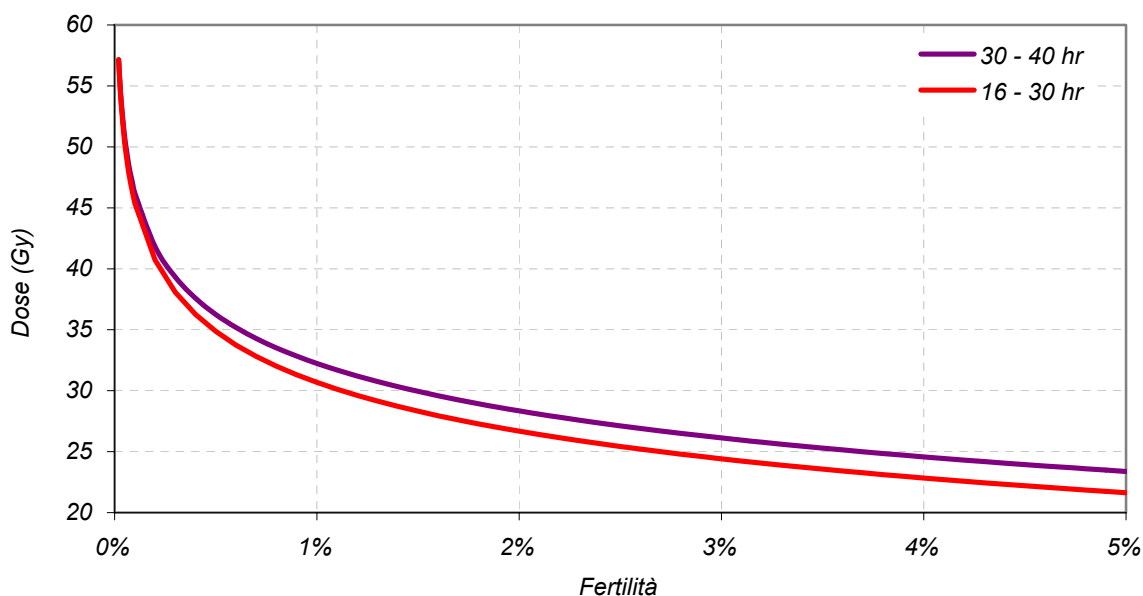


Fig. 3.10 - Curve Dose Radiazione / Fertilità Residua - Corretta Con Abbott (età pupe)



Nella seguente tabella (Tab. 3.22) vengono riportati i parametri di regressione delle rette di fertilità residua calcolate per i ceppi Rimini, Pinerolo e Cesena a 16-30h. Le rette dei tre ceppi valutate in funzione dell'età pupale di irraggiamento 16-30 hr sono parallele ($F=2,05$ and $P=0,17$) ma non coincidenti ($F=4,47$ and $P=0,033$) (Fig. 3.11). I diversi ceppi mostrano cioè lo stesso andamento di riduzione della fertilità in funzione della dose ricevuta ma con intensità differenti.

Tab. 3.22 - Parametri di regressione delle rette di fertilità residua dei ceppi irraggiati in età pupale 16-30h

Rimini 16-30 hr

Regression Summary: $R = ,97182301$ $R^2 = ,94443997$ Adjusted $R^2 = ,93054996$

$F(1,4) = 67,994$ $p < ,00118$ Std.Error of estimate: $,16472$

	Beta	Std.Err.	B	Std.Err.	t(4)	p-level
Intercept			4,35041	0,797965	5,45188	0,005500
logR16	-0,971823	0,117856	-4,49054	0,544581	-8,24586	0,001180

Pinerolo 16-30 hr

Regression Summary: $R = ,95848855$ $R^2 = ,91870031$ Adjusted $R^2 = ,89837538$

$F(1,4) = 45,201$ $p < ,00255$ Std.Error of estimate: $,15490$

	Beta	Std.Err.	B	Std.Err.	t(4)	p-level
Intercept			2,27855	0,645185	3,53162	0,024195
LogP16	-0,958489	0,142566	-2,92421	0,434947	-6,72314	0,002549

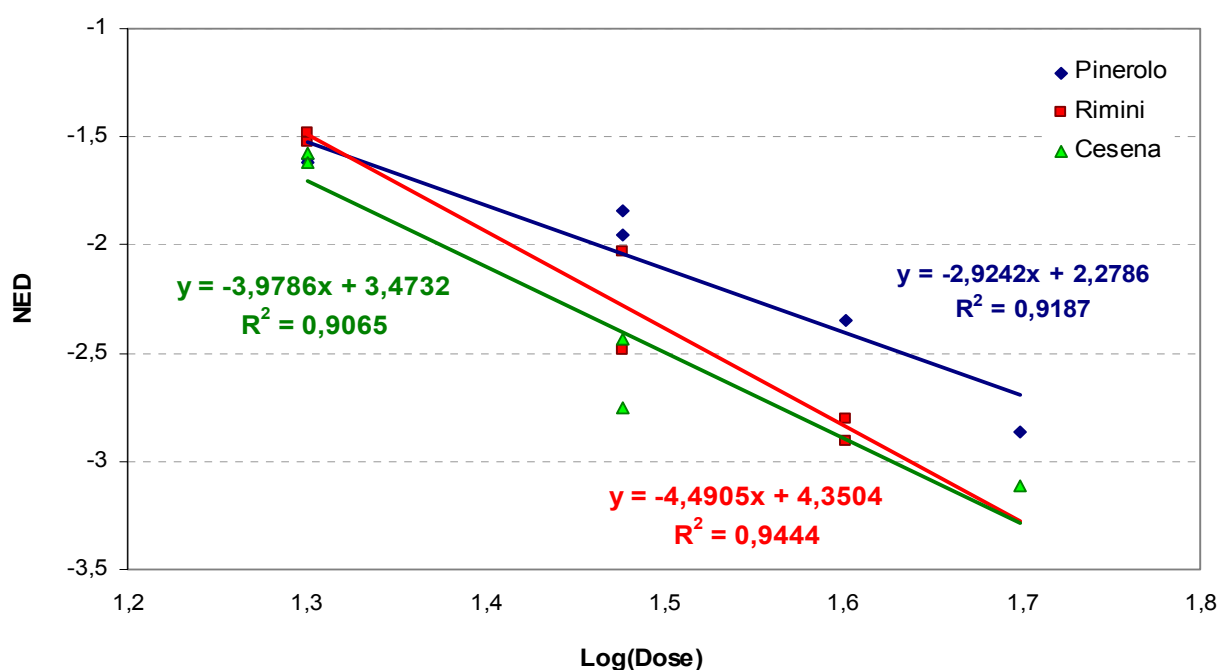
Cesena 16-30 hr

Regression Summary: $R = ,95212855$ $R^2 = ,90654878$ Adjusted $R^2 = ,87539837$

$F(1,3) = 29,102$ $p < ,01248$ Std.Error of estimate: $,24218$

	Beta	Std.Err.	B	Std.Err.	t(3)	p-level
Intercept			3,47317	1,075619	3,22900	0,048253
LogC16	-0,952129	0,176495	-3,97856	0,737500	-5,39466	0,012483

Fig. 3.11 - Test di parallelismo fertilità Rimini-Pinerolo-Cesena 16-30h



Le rette di regressione calcolate per Rimini 16-30 e Rimini 30-40 h sono parallele ($t=-1,22$ and $P=0,24$) e coincidenti ($t=0,39$ and $P=0,70$) (Fig.3.12). Nel ceppo di Rimini quindi non si osservano differenze nella fertilità residua su pupe irraggiate a 16-30 e 30-40 h per le diverse dosi esaminate (Tab.3.23, Fig.3.12).

Tab. 3.23 - Parametri di regressione delle rette di fertilità residua del ceppo Rimini per età pupale 16-30h e 30-40h

Rimini 16-30 hr

Regression Summary: $R=,97182301$ $R^2=,94443997$ Adjusted $R^2=,93054996$
 $F(1,4)=67,994$ $p<,00118$ Std.Error of estimate: $,16472$

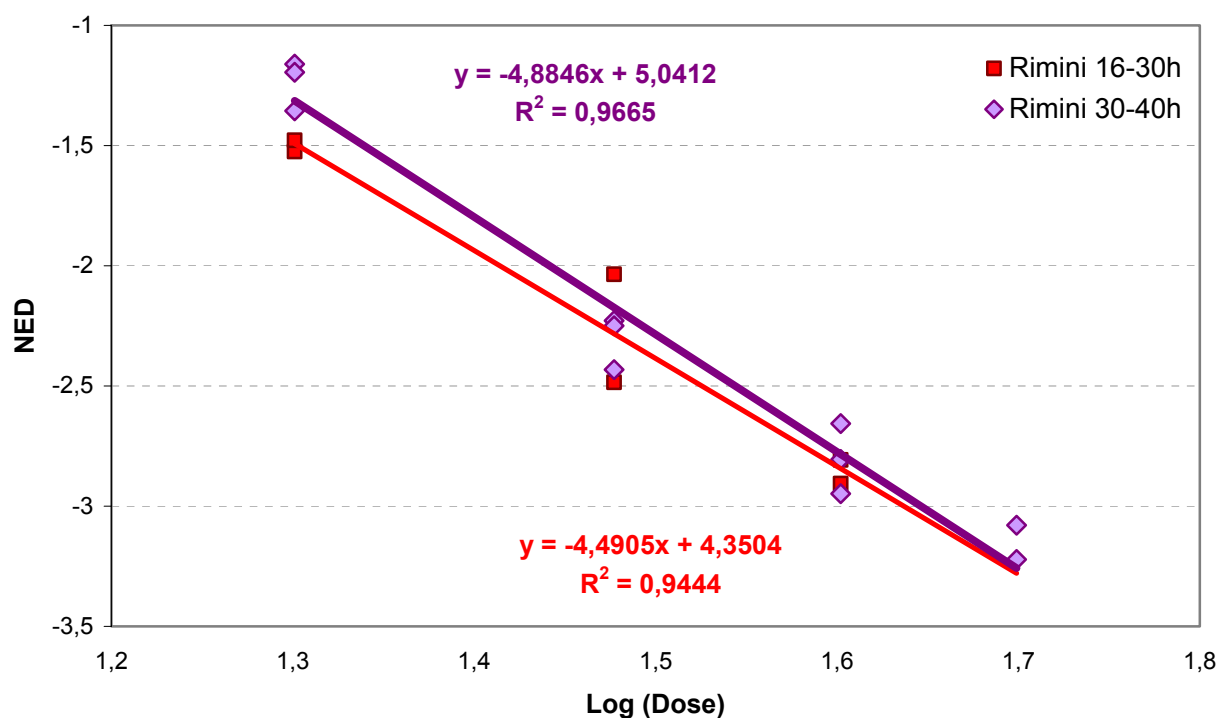
	Beta	Std.Err.	B	Std.Err.	t(4)	p-level
Intercept			4,35041	0,797965	5,45188	0,005500
logR16	-0,971823	0,117856	-4,49054	0,544581	-8,24586	0,001180

Rimini 30-40 hr

Regression Summary: $R=,98308258$ $R^2=,96645136$ Adjusted $R^2=,96272373$
 $F(1,9)=259,27$ $p<,00000$ Std.Error of estimate: $,14568$

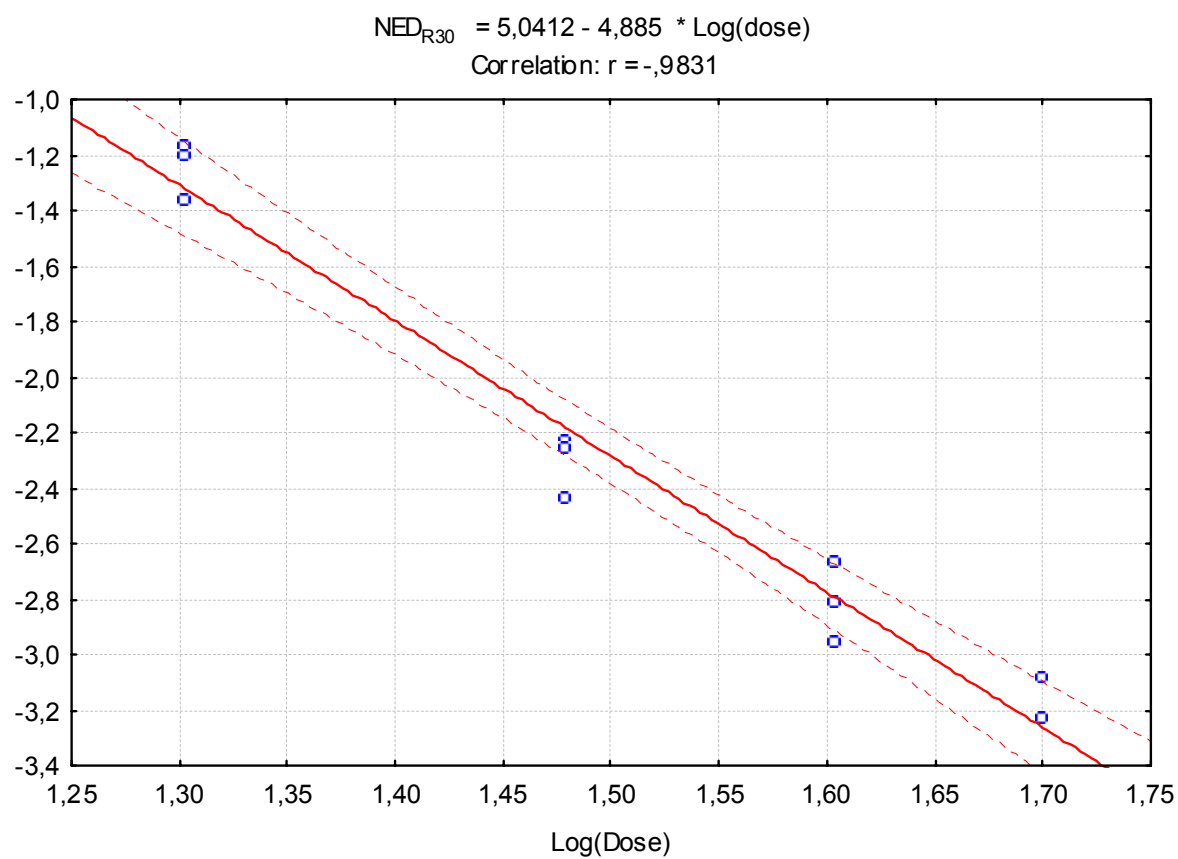
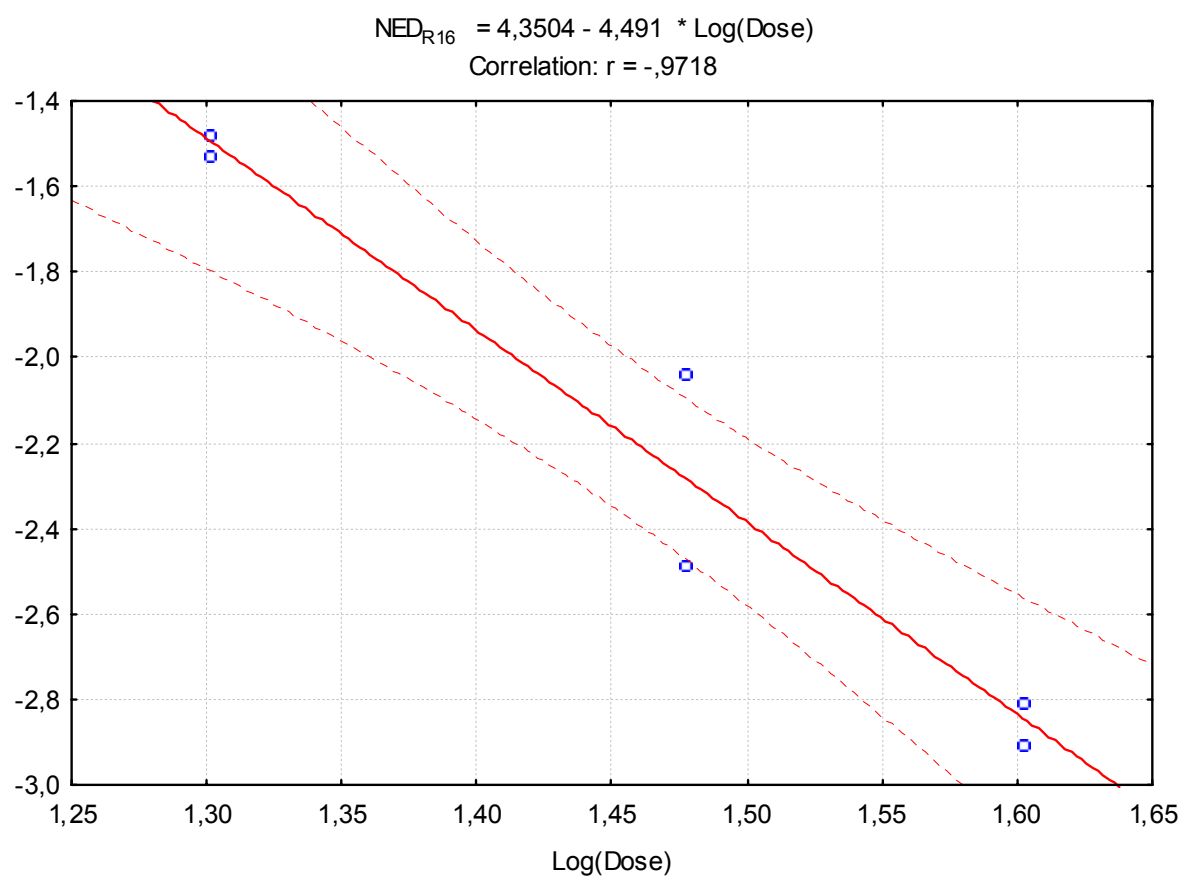
	Beta	Std.Err.	B	Std.Err.	t(9)	p-level
Intercept			5,04115	0,458213	11,0018	0,000002
LogR30	-0,983083	0,061054	-4,88462	0,303359	-16,1018	0,000000

Fig. 3.12 - Test di parallelismo fertilità Rimini 16-30h - Rimini 30-40h



Nella pagina seguente si possono apprezzare graficamente le rette di regressione per Rimini 16-30h e Rimini 30-40h descritte con i rispettivi intervalli di confidenza 95% (Fig.3.13)

Fig. 3.13 - Rette di regressione fertilità residua del ceppo Rimini irraggiato a 16-30h (sopra) e 30-40h (sotto)



3.3 - Prove di Competizione

3.3.1 - Prova preliminare in tunnel 2006 (50 - 60 Gy)

Si sono realizzate prove preliminari di competizione confrontando ceppi raccolti in campo e allevati in laboratorio realizzando una prova preliminare in tunnel testimoni per l'analisi della fertilità e fecondità naturale degli adulti fertili nell'ambiente di prova. Le analisi dei livelli di fertilità sono state condotte in laboratorio misurando le percentuali di schiusura delle uova raccolte nei tunnel mediante l'impiego di 4 ovitrappele a listelle di masonite posizionate in 4 zone ombreggiate.

In tabella 3.24 sono riportati i dati raccolti nel corso delle prove in tunnel 2006.

Tab. 3.24 - Dati prove in tunnel 2006

Data	Prova	Gy	Ceppo*	Totale uova	Larve	N° uova femmina	% Schiusura	IC
20/06 - 05/07	T1_1	T	A_A	1045	1011	32,66	96,75%
20/06 - 05/07	T1_2	T	A_A	1755	1725	45	98,29%
20/06 - 05/07	T1_3	T	A_A	1413	1208	36,23	85,49%
20/06 - 05/07	T1_4	T	A_A	3629	2890	39,02	79,64%
17/08 - 31/08	T4_4	T	S_S	2077	1504,2	47,2	72,42%
06/07 - 26/07	T2_1	60	SA_S	378	73,3	9,95	19,39%	2,742
06/07 - 26/07	T2_2	60	AS_S	848	415,7	30,29	49,02%	0,838
06/07 - 26/07	T2_3	60	AA_A	799	557,7	38,05	69,80%	0,290
06/07 - 26/07	T2_4	60	AA_A	328	260,6	82	79,45%	0,133
27/07 - 11/08	T3_1	50	SA_S	1203	660,1	24,06	54,87%	0,320
27/07 - 11/08	T3_2	50	AS_S	1910	981,8	38,2	51,40%	0,752
27/07 - 11/08	T3_3	50	SA_S	1365	867,1	22,38	63,52%	0,140
27/07 - 11/08	T3_4	50	SA_S	2804	517,9	44,51	18,47%	2,929
17/08 - 31/08	T4_1	50	SS_S	1910	903,9	41,52	47,32%	0,531
17/08 - 31/08	T4_2	50	SS_S	1377	460	22,57	33,41%	1,170
17/08 - 31/08	T4_3	50	SS_S	2159	342,7	44,06	15,87%	3,574

* (Maschi Sterili) (Maschi Fertili) _ (Femmine) →

S = Selvatico

A = Allevamento

S = Rimini campo

A = Rimini 5; Rimini 6

Le prove in tunnel sono state condotte dal 20 Giugno al 31 Agosto 2006 in località Anzola Emilia. Per tutto il periodo di svolgimento delle prove sono stati annotati i valori di temperatura minima e massima, di precipitazione e di umidità relativa media registrati dalle stazioni del Servizio Meteorologico Regionale ARPA per le zone di svolgimento delle prove. L'andamento dei dati ambientali nel periodo di prova è mostrato in figura 3.14 e 3.15.

Fig. 3.14 - Andamento della Temperature minime e massime (Zola Predosa _ Borgo Panigale)

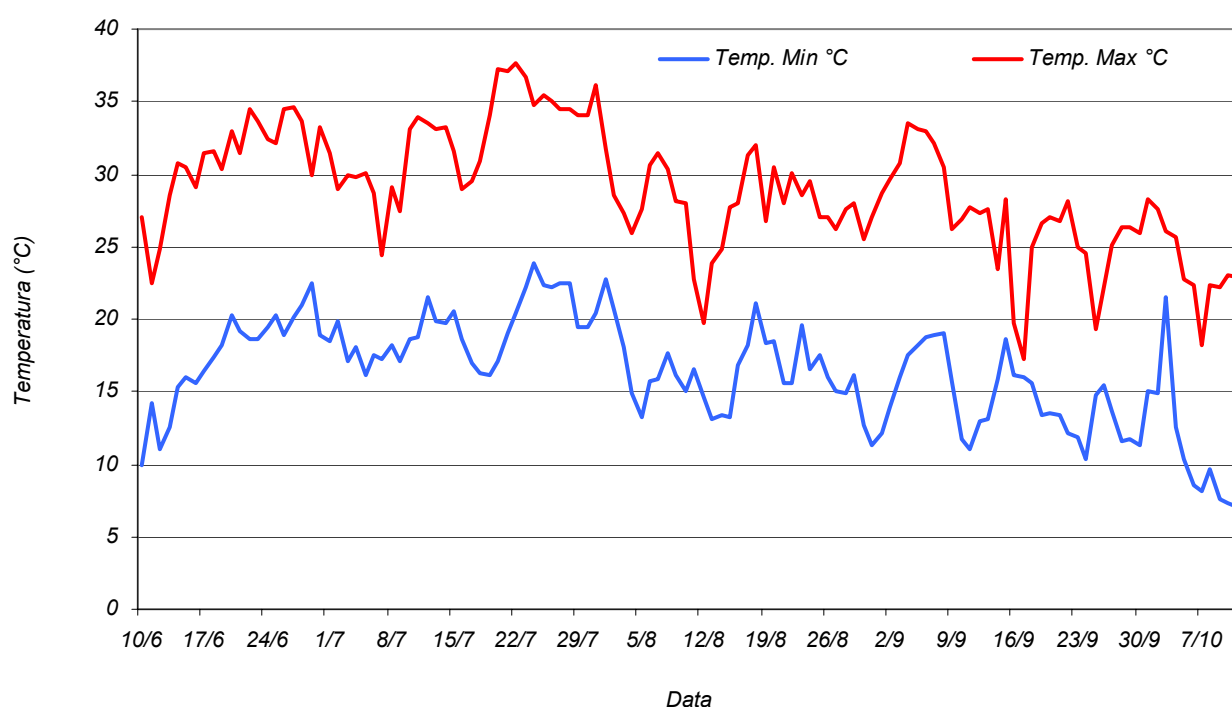
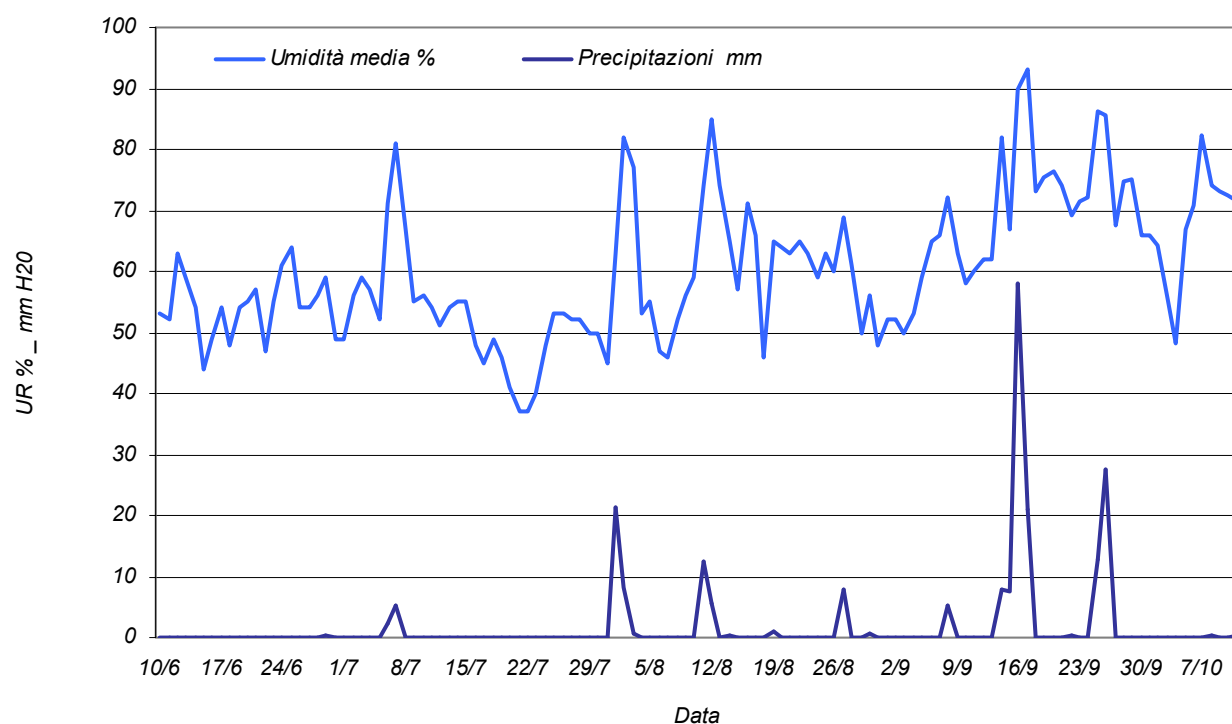


Fig. 3.15 - Andamento dell'UR% media e delle precipitazioni (Zola Predosa _ Borgo Panigale)

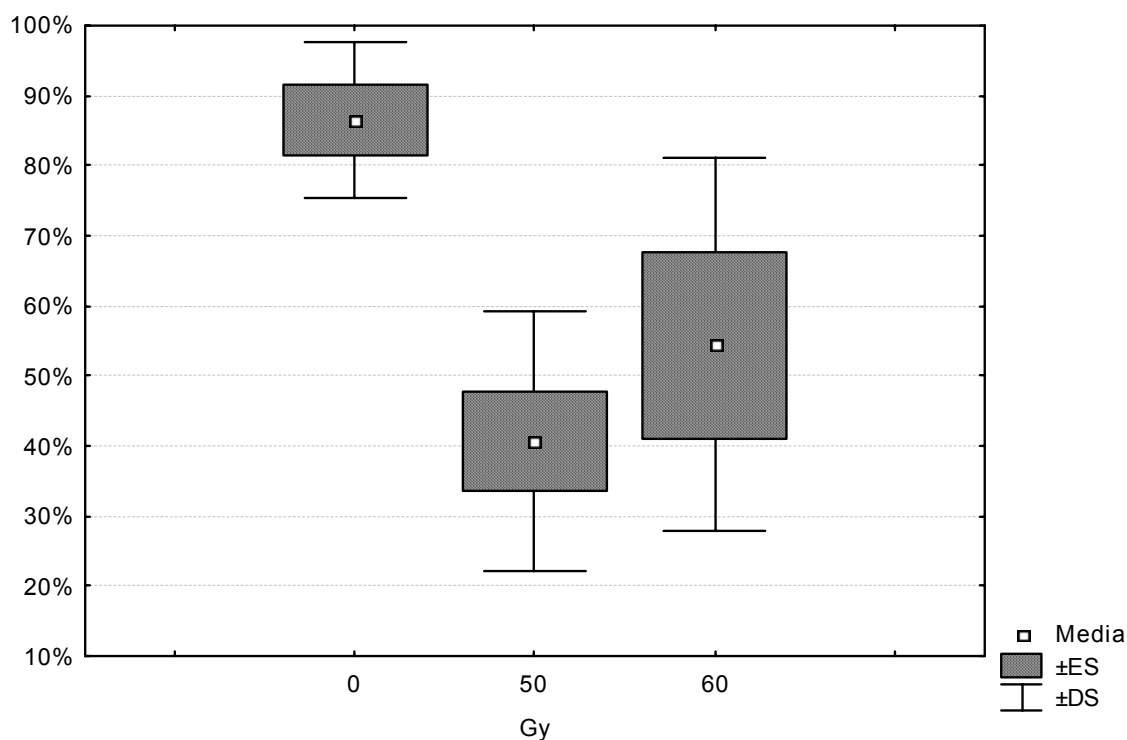


Dai dati registrati in laboratorio sulle percentuali di schiusura delle uova deposte dalle femmine si evidenziano differenze significative in funzione della dose di irraggiamento ($F=8,68$ $p=0,004$)(Tab. 3.24). Nel testimone si osservano percentuali di schiusura medie del 86,5%, mentre le uova deposte da femmine accoppiatesi in tunnel con maschi sterili e fertili in competizione schiudono con percentuali medie del 47,6% (Tab.3.24). Non si osservano invece differenze significative nell'efficacia sterilizzante sul maschio alle dosi di irraggiamento 50 (40,7%) e 60 Gy (54,4%)(Tab.3.25, Fig.3.16 *Test Nemann_Keuls*).

Tab. 3.25 - Percentuale di schiusura in funzione della dose di irraggiamento del campione

Gy	N	% schiusura	IC
Test	5	86,52 ± 11,07	---
G50	7	40,70 ± 18,46	1,35 ± 1,36
G60	4	54,42 ± 26,58	1,00 ± 1,20
All Grps	16	60,54 ± 7,76	

Fig. 3.16 - Effetto della dose di irraggiamento sulla percentuale di schiusura

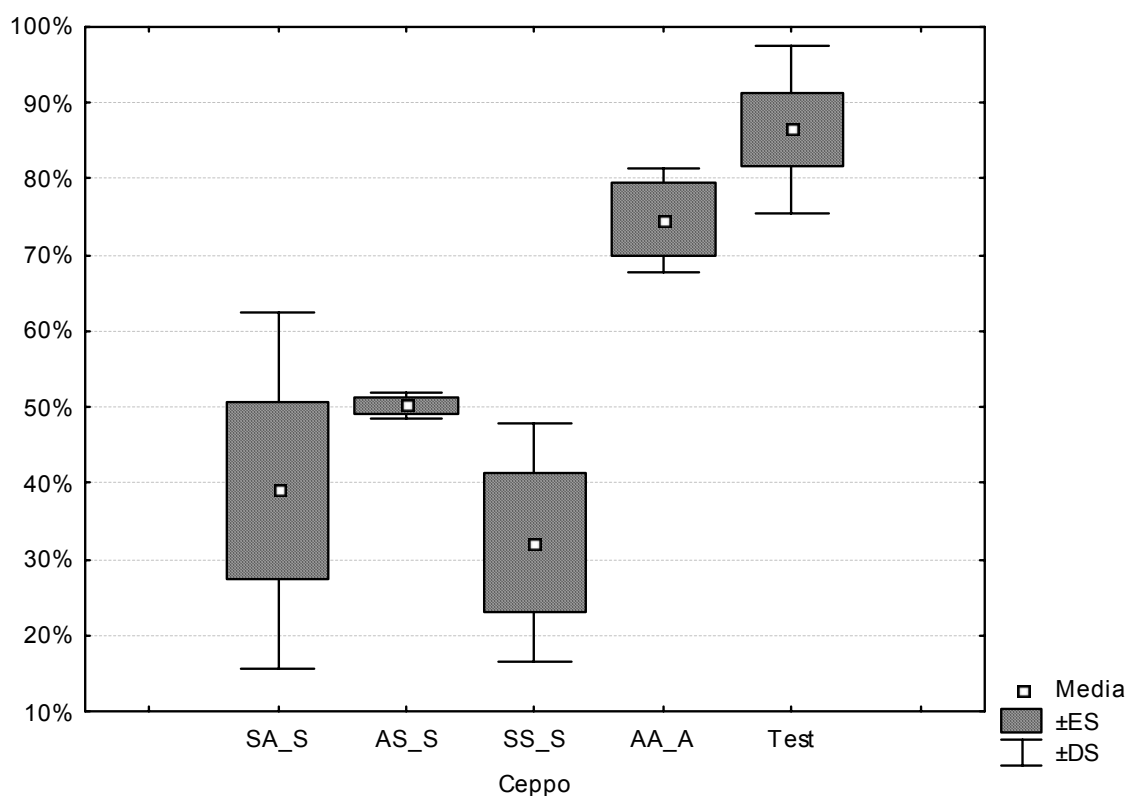


L'analisi dei dati condotta analizzando gli effetti delle diverse combinazioni di ceppi di *Ae.albopictus* utilizzate nelle prove in tunnel, non mostra differenze significative ($F=8,33$ $p=0,002$). Non si riscontrano quindi differenze sensibili nell'efficacia di accoppiamento tra maschi (sterili e fertili) e femmine provenienti da materiale raccolto in campo (**S** = *selvatico*) e/o provenienti dal laboratorio (**A** = *allevamento*) (Tab. 3.26) (Fig. 3.17).

Tab. 3.26 - Percentuale di schiusura in funzione dei ceppi impiegati (S = Selvatico; A = Allevamento)

Gy	n	% schiusura	IC
Test	5	86,52 ± 11,07	---
SA_S	4	39,06 ± 23,52	1,53 ± 1,51
AS_S	2	50,21 ± 1,68	0,8 ± 0,06
AA_A	2	74,63 ± 6,82	0,21 ± 0,11
SS_S	3	32,2 ± 15,76	1,76 ± 1,60
All Grps	16	49,03 ± 9,66	

Fig. 3.17 - Effetto della combinazione del ceppo impiegato sulla percentuale di chiusura



I dati di competizione emersi in questa prova (Tab. 3.25, 3.26 - **IC**) evidenziano grande variabilità. Secondo quanto emerge dagli Indici di Competizione (**IC**) di Fried i maschi irraggiati a 50 e 60 Gy sembrano mediamente più competitivi dei rispettivi competitori fertili (**IC** > 1).

Le prove di competizione in tunnel condotte irraggiando pupe di 16-48h di età a 50 e 60Gy erano realizzate immettendo le femmine in tunnel a 1 giorno dai maschi i quali erano posizionati in tunnel ancora allo stadio pupale.

Per l'analisi della grande variabilità dei dati osservati nel corso di queste prove di competizione e degli elevati valori degli indici di Fried si sono condotte prove in laboratorio per l'analisi degli effetti delle radiazioni sui tempi di rotazione genitale, sulla velocità ed efficacia degli accoppiamenti e sui tempi di sfarfallamento dei maschi irraggiati a differenti dosi. Infine su femmine di *Ae. albopictus* si sono realizzate prove in gabbia per lo studio dei tempi di recettività all'accoppiamento.

Infine in tabella 3.27 si riportano i dati della percentuale di schiusura osservata in laboratorio con l'impiego di soli esemplari sterili per le correzioni necessarie per il calcolo della competitività dei diversi ceppi nei tunnel realizzati

Tab. 3.27 - Percentuali di schiusura in laboratorio (solo sterili) dei ceppi impiegati in competizione.

Ceppo	Dose	Fertilità residua (% di schiusura)
A = Ceppo Allevamento (Rimini 5 - 6)	50 Gy	0,051
	60 Gy	0,049
S = Ceppo Selvatico (Rimini)	50 Gy	0,983
	60 Gy	0,076

3.3.2 - Analisi dell'efficacia di accoppiamento nei maschi irraggiati

I dati ottenuti nelle prove di accoppiamento sono riportati nelle Tab. 3.28, 3.29A e 3.29B

Dalle prime prove non si evidenziano differenze significative nelle percentuali di accoppiamento delle femmine (N. Femmine accoppiate/ N. Femmine impiegate) in funzione della dose di radiazioni somministrata ai maschi (Tab. 3.28). Non si osservano differenze nelle percentuali di accoppiamento delle femmine nemmeno in funzione dei tempi di accoppiamento.

Tab. 3.28 - Dati prova preliminare di accoppiamento maschi irraggiati a 30, 40 e 50 Gy

1 maschio (3-5gg) / 10 femmine (3gg)

Dose	N	tempo di accoppiamento (h)	spermateche piene			femmine non fecondate	% di accoppiamento
			1/3	2/3	3/3		
TEST	3	2-4	0	5	0	25	16,7 ± 20,8
30 Gy	3	2-4	0	3	0	27	10,0 ± 0,0
40 Gy	3	2-4	0	2	0	28	6,7 ± 11,5
50 Gy	3	2-4	1	4	0	25	16,7 ± 5,8
TEST	2	24	1	4	3	7	55,0 ± 7,1
30 Gy	2	24	0	3	1	11	35,0 ± 35,4
40 Gy	2	24	1	5	2	7	65,0 ± 49,5
50 Gy	2	24	2	2	1	10	30,0 ± 14,1

Nella seconda prova (Tab. 3.29A, 3.29B) condotta su maschi irraggiati a 30, 40 e 50 Gy sono stati registrati in continuo in ogni gabbia il numero di accoppiamenti effettuati nelle 4 ore di prova da 4 maschi di 4 ore di età posizionati in gabbia con 20 femmine sessualmente recettive (età 3gg).

Tab. 3.29A - Dati seconda prova di accoppiamento maschi irraggiati a 30, 40 e 50 Gy

4maschi / 20 femmine

Dose	età maschi (gg)	tempo di accoppiamento (h)	spermateche piene			femmine non fecondate	% di accoppiamento
			1/3	2/3	3/3		
TEST	4	2	0	5	2	13	35,0%
TEST	4	2	0	8	3	9	55,0%
30 Gy	4	2	2	7	0	13	40,9%
30 Gy	4	2	4	4	0	12	40,0%
40 Gy	4	2	2	6	2	13	43,5%
40 Gy	4	2	2	8	2	8	60,0%
50 Gy	4	2	0	2	0	20	9,1%
50 Gy	4	2	1	4	0	15	25,0%

Tab. 3.29B - Dati seconda prova di accoppiamento maschi irraggiati a 30, 40 e 50 Gy
4maschi / 20 femmine

Dose	N. F. accopp	N spermateche	N. F. fecond / M	N. Sperm / M	N. accopp	N. accopp. / M	Efficienza accopp.
TEST	7	16	1,75	4	9	2,25	0,78
TEST	11	25	2,75	6,25	18	4,5	0,61
30 Gy	9	16	2,25	4	9	2,25	1,00
30 Gy	8	12	2	3	12	3	0,67
40 Gy	10	20	2,5	5	9	2,25	1,11
40 Gy	12	24	3	6	14	3,5	0,86
50 Gy	2	4	0,5	1	12	3	0,17
50 Gy	5	9	1,67	3	8	2,67	0,63

L'analisi della velocità media è stata valutata per ogni singola gabbia di prova, attraverso la misurazione dei tempi necessari a realizzare i primi 4 accoppiamenti. Dai dati ottenuti nella seconda prova, non è possibile evidenziare una significatività statistica ($F=3,8$; $P=0,112$) ma appare evidente che nel testimone i maschi sembrano più reattivi, con tempi leggermente inferiori ai tempi di accoppiamento impiegati dai maschi 30 e 40 Gy mentre a 50 Gy la reattività dei maschi è nettamente inferiore (Fig. 3.18 Tab. 3.30).

Tab. 3.30 - Velocità media dei primi 4 accoppiamenti per i maschi irraggiati alle diverse dosi

Dose (Gy)	N	Velocità 4 Acc. (sec)
TEST	2	13,5 ± 6,72
30 Gy	2	19,66 ± 6,89
40 Gy	2	20,13 ± 6,19
40 Gy	2	34,13 ± 5,13
All Grps	8	21,84 ± 9,36

Nel numero di femmine fecondate per maschio non si osservano differenze sostanziali tra il testimone ed i maschi sottoposti a 30 e 40 Gy, mentre a 50 Gy il numero di femmine accoppiate cioè di femmine con spermatozoi è nettamente inferiore (Fig.3.19; Tab.3.31, 3.32). In media 1 maschio è in grado di fecondare 2,4 femmine. Il numero totale di spermatozoi con spermatozoi (Tot. Sperm.) segue il medesimo andamento e in media 1 maschio è in grado di riempire 4,7 spermatozoi (Tab.3.31, 3.32; Fig.3.20). Il numero medio di accoppiamenti realizzati da un maschio (N.Acc/M) non mostra differenze sostanziali tra il testimone e i maschi irraggiati alle diverse intensità fornite. Nell'analisi della efficienza di accoppiamento (N° femmine accoppiate/ N° accoppiamenti) i maschi irraggiati a 50 Gy sembrano essere nettamente inferiori rispetto ai maschi irraggiati alle dosi più basse (Tab.3.31, 3.32).

Fig. 3.18 - Analisi della velocità media dei primi 4 accoppiamenti di 4 maschi

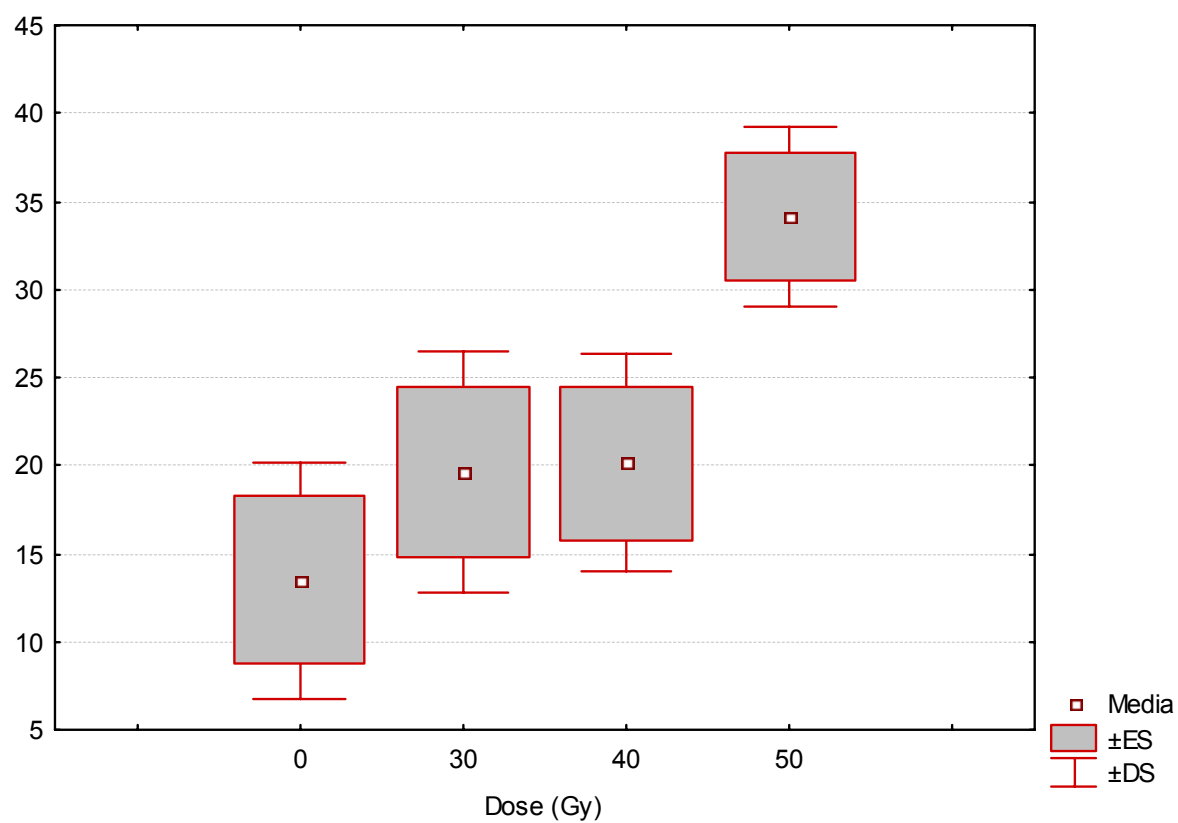
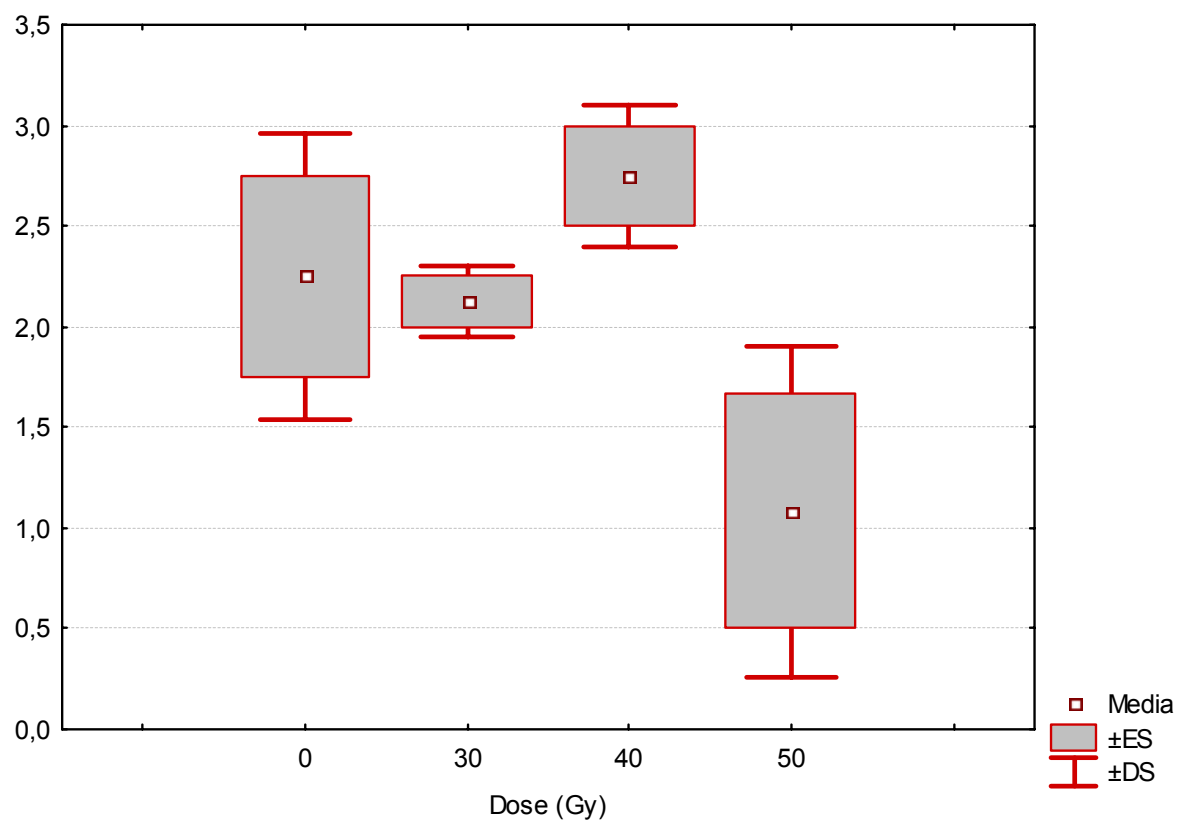


Fig. 3.19 - Numero medio di femmine fecondate da un maschio



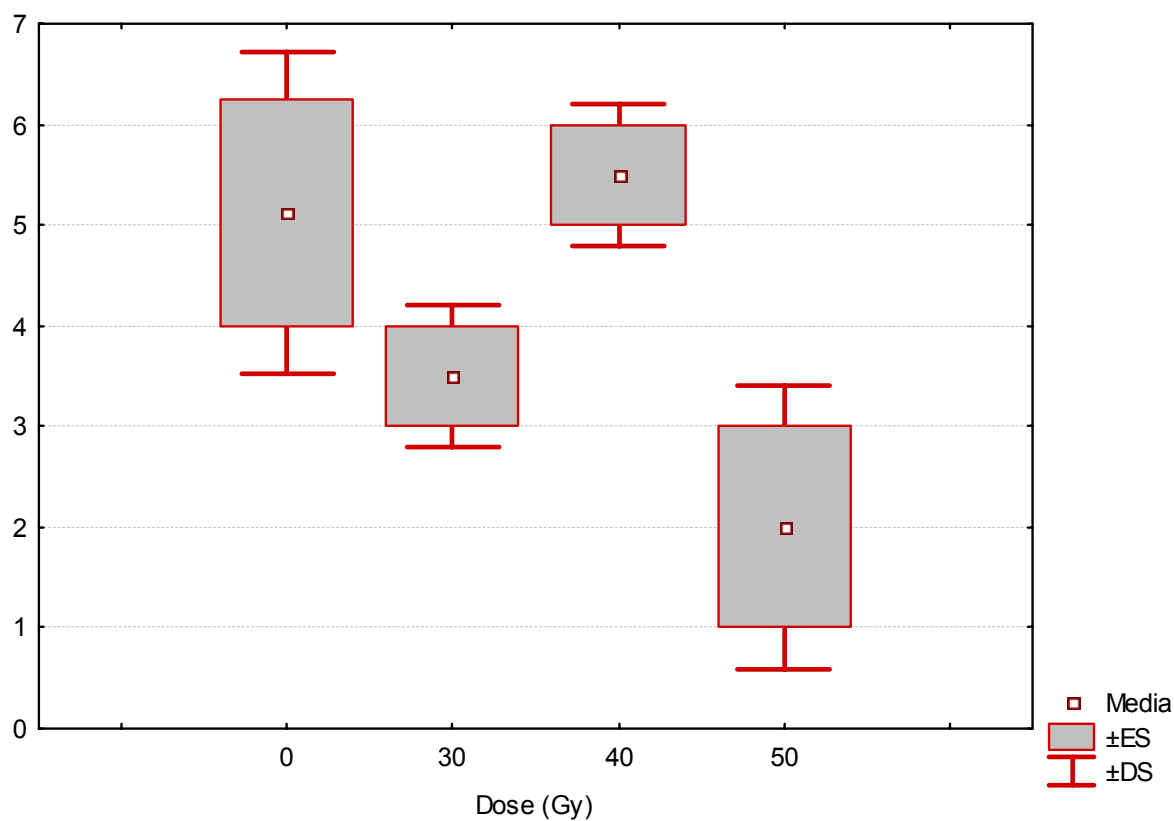
Tab. 3.31 - Tavola dei parametri registrati nella prova di accoppiamento (Valori medi e deviazioni standard)

Dose	N	Tot. F. acc.		Tot. Sperm.		N.Acc/M		N.F.fec/M		N.Sperm/M		Efficienza acc.	
		Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS
0	2	9,00	2,83	20,5	6,36	3,38	1,59	2,25	0,71	5,13	1,59	0,69	0,12
30	2	8,50	0,71	14,0	2,83	2,63	0,53	2,13	0,18	3,50	0,71	0,83	0,24
40	2	11,00	1,41	22,0	2,83	2,88	0,88	2,75	0,35	5,50	0,71	0,98	0,18
50	2	3,50	2,12	6,5	3,54	2,83	0,24	1,08	0,82	2,00	1,41	0,40	0,32
All Grps	8	8,00	3,30	15,8	7,27	2,93	0,78	2,05	0,78	4,03	1,73	0,73	0,29

Tab. 3.32 - ANOVA dei parametri registrati nella prova di accoppiamento

	SS	df	MS	SS	df	MS	F	p
Totale Femmine accopp.	61,000	3	20,333	15,000	4	3,750	5,422	0,068
Tot spermateche	300,500	3	100,167	69,000	4	17,250	5,807	0,061
N. accoppiamenti / M	0,607	3	0,202	3,649	4	0,912	0,222	0,877
N.F.fec / M	2,940	3	0,980	1,337	4	0,334	2,932	0,163
N.Sperm / M	15,523	3	5,175	5,531	4	1,383	3,742	0,117
Efficienza acc (N Facc / Nacc)	0,376	3	0,125	0,207	4	0,052	2,427	0,206

Fig. 3.20 - Numero medio di spermatozoi riempiti da un maschio



3.3.3 - Analisi della precocità di sfarfallamento nei maschi irraggiati

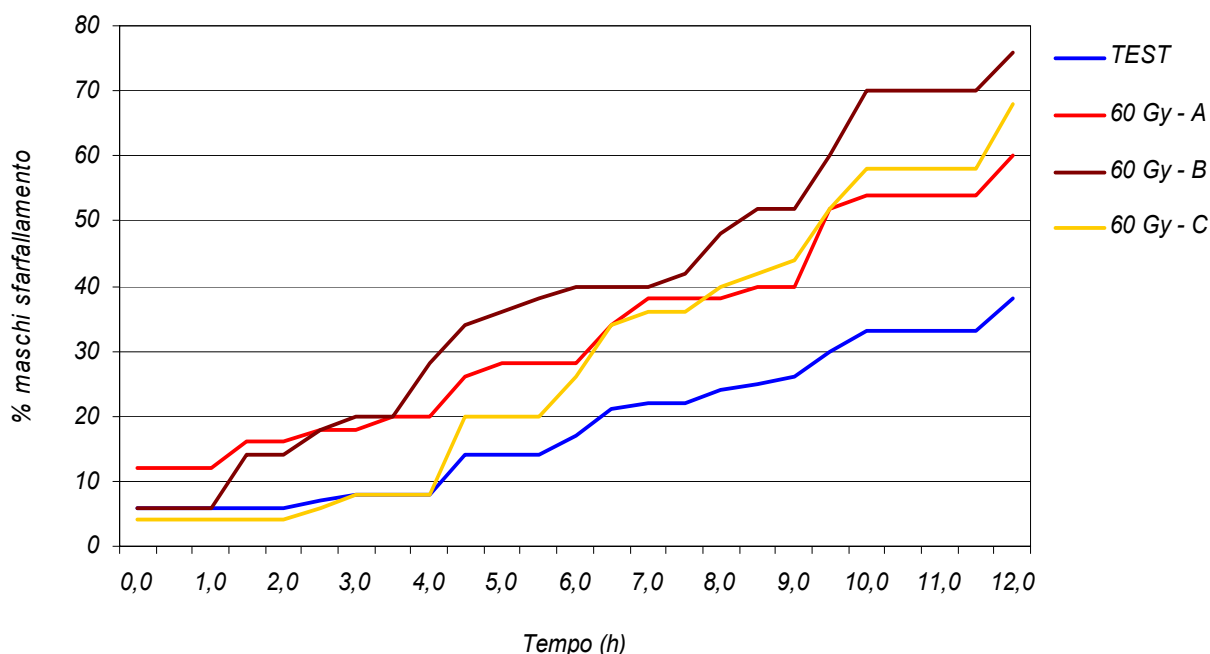
L'andamento dello sfarfallamento orario medio di maschi irraggiati alle diverse età pupali è stato calcolato attraverso il conteggio ogni 30 minuti e la rimozione progressiva delle esuvie pupali.

Nelle prove condotte su pupe irraggiate a 20,30,40 e 50 Gy in età pupale 16-30h e 30-40h non si osservano differenze significative nei tempi di sfarfallamento degli adulti in rapporto al testimone non irraggiato. L'irraggiamento di pupe di 16-30 hr e 30-40 hr di età non sembra determinare evidenti variazioni nemmeno nella percentuale di sfarfallamento delle pupe irradiate, che risulta comunque alta, con una media di $99,93 \pm 0,19\%$.

Differenze significative si evidenziano invece nella prova condotta a 60 Gy sulla verifica dei tempi di sfarfallamento per le pupe irraggiate a 30-40 h di età in rapporto al testimone non irraggiato.

In figura 3.21 si osserva l'andamento dello sfarfallamento orario medio registrato in questa prova.

Fig. 3.21 - Andamento dello sfarfallamento orario medio per pupe di 30-40h di età irraggiate a 60 Gy (N =3 - A,B,C).



Le rette di regressione calcolate per i maschi testimone e per i maschi irraggiati a 60 Gy sono descritte nelle seguenti tabelle (Tab. 3.33) e vengono rappresentate in figura 3.22.

Tab. 3.33 - Parametri di regressione retta dei tempi di sfarfallamento per maschi irraggiati a 60 Gy e per il testimone

60 Gy

Regression Summary: $R = ,98920295$ $R^2 = ,97852247$ Adjusted $R^2 = ,97758867$
 $F(1,23) = 1047,9$ $p < 0,0000$ Std.Error of estimate: $,02956$

60 Gy	Beta	Std.Err.	B	Std.Err.	t(23)	p-level
Intercept			0,020062	0,011341	1,76908	0,090141
Ora	0,989203	0,030558	0,053061	0,001639	32,37108	0,000000

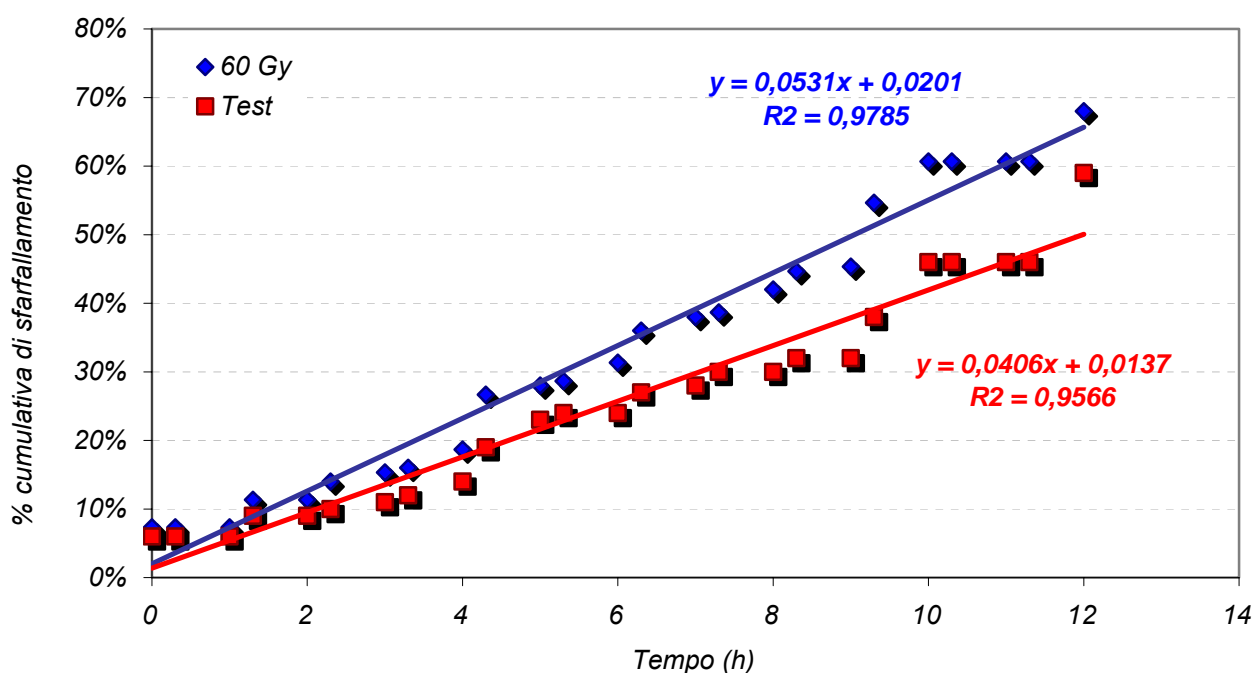
Test

Regression Summary: $R = ,97807769$ $R^2 = ,95663598$ Adjusted $R^2 = ,95475059$

$F(1,23)=507,39$ $p<,00000$ Std.Error of estimate: ,03248

60 Gy	Beta	Std.Err.	B	Std.Err.	t(23)	p-level
Intercept			0,013687	0,012460	1,09848	0,283363
Ora	0,978078	0,043421	0,040568	0,001801	22,52540	0,000000

Fig. 3.22 - Andamento delle rette di regressione delle percentuali di sfarfallamento - Testimone vs. 60Gy



Il test di parallelismo condotto sulle rette presentate ($t=5,13$ $DF=46$ $p=0,000006$), evidenzia che le rette sono coincidenti ($t=1,073$ and $P=0,855$) ma non sono parallele ($t=5,13$ e $p<0,0001$).

Il 50 % di sfarfallamento nei maschi irraggiati con 60 Gy avviene circa 2,94 ore prima rispetto al testimone, mentre il 90 % di sfarfallamento dei maschi irraggiati avviene 5,26 ore prima rispetto al testimone.

Le radiazioni prodotte a 60 Gy sembrano avere quindi un effetto precocizzante sullo sfarfallamento delle pupae trattate.

3.3.4 - Analisi dei tempi di rotazione dei genitali nei maschi irraggiati

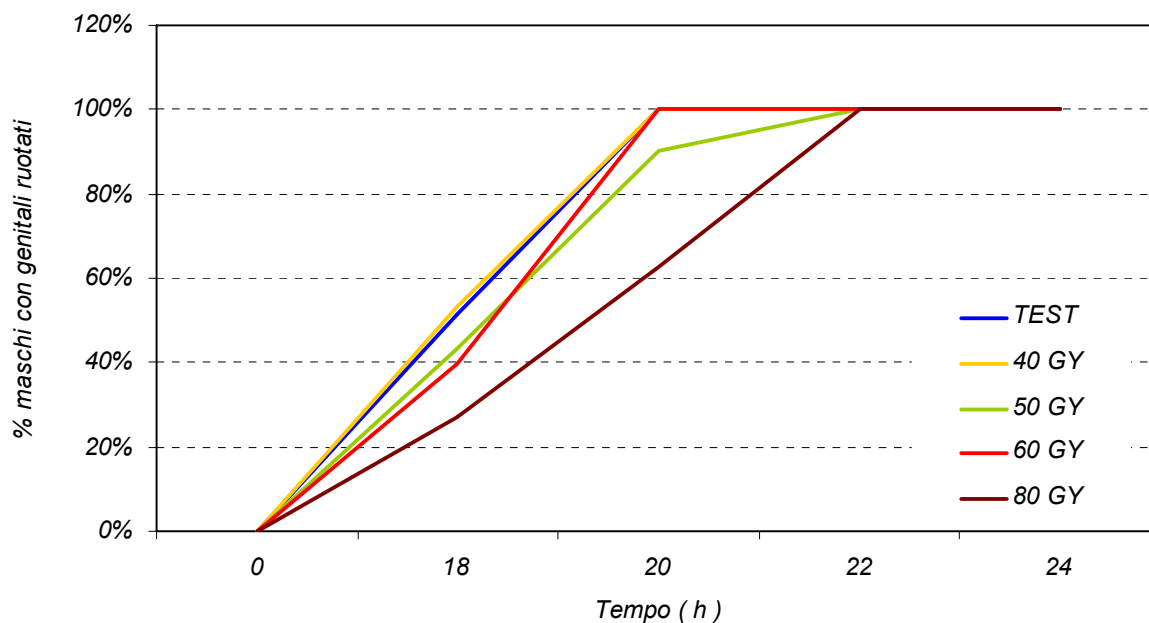
Dai primi dati raccolti, l'irraggiamento sembra influenzare i tempi di rotazione dei genitali nei maschi evidenziando un ritardo che appare dipendente alla dose ricevuta.

In tabella 3.34 si osservano i dati registrati sulla diverse fasce di età dei maschi adulti testate a differenti dosi di irraggiamento. In figura 3.23 sono mostrate graficamente le percentuali di maschi con genitali non ruotati alle due fasce di età testate 0-18h e 20-22h.

Tab. 3.34 - Percentuale di maschi con genitali non ruotati a differenti età e dosi testate.

Dose	0-18h	18-20h	20-22h
0 Gy	48,53	0,0	0,0
40 Gy	46,96	0,0	0,0
50 Gy	56,63	10,0	0,0
60 Gy	60,22	0,0	0,0
80 Gy	72,73	37,50	0,0

Fig. 3.23 - Andamento della % di maschi con genitali ruotati a differenti età e dosi testate.



Ulteriori prove sono necessarie per evidenziare con chiarezza questo ritardo di sviluppo e la sua correlazione con la dose di irraggiamento fornito alle pupe.

3.3.5 - Analisi recettività sessuale delle femmine

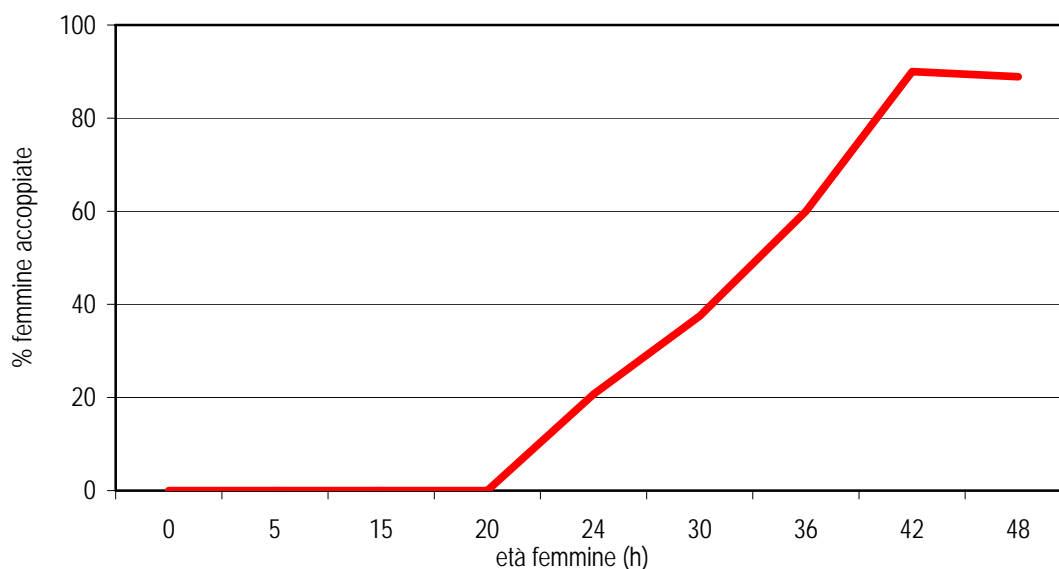
In tabella 3.35 vengono presentati i dati raccolti nello studio e nella Fig. 3.24 viene descritto l'andamento grafico della recettività delle femmine accoppiate in funzione dell'età.

Tab. 3.35 - Dati prova recettività femmine

10 femmine + 2 maschi >24h / 2 ore

età femmine (h)	femmine con spermatozoi	femmine senza spermatozoi	% femmine recettive (accop.)	% femmine non recettive	n° femmine fecondate / maschio
14	0	10	0,0	100,0	0
16	0	10	0,0	100,0	0
20	0	10	0,0	100,0	0
20	0	10	0,0	100,0	0
24	2	8	20,0	80,0	0,2
24	3	7	30,0	70,0	0,3
24	1	8	11,1	88,9	0,1
30	6	1	85,7	14,3	0,6
36	6	4	60,0	40,0	0,6
42	9	1	90,0	10,0	0,9
48	8	1	88,9	11,1	0,8

Fig. 3.24 - Andamento della recettività delle femmine accoppiate in funzione dell'età di accoppiamento.



L'andamento del grafico in figura 3.24 mostra una correlazione tra l'età delle femmine e la loro recettività agli accoppiamenti (% femmine accoppiate). La regressione è descritta dalla formula:

$$\text{Arcsen (\% di Femmine recettive)} = 2,98 * [\text{Log (1+età)}] - 3,697$$

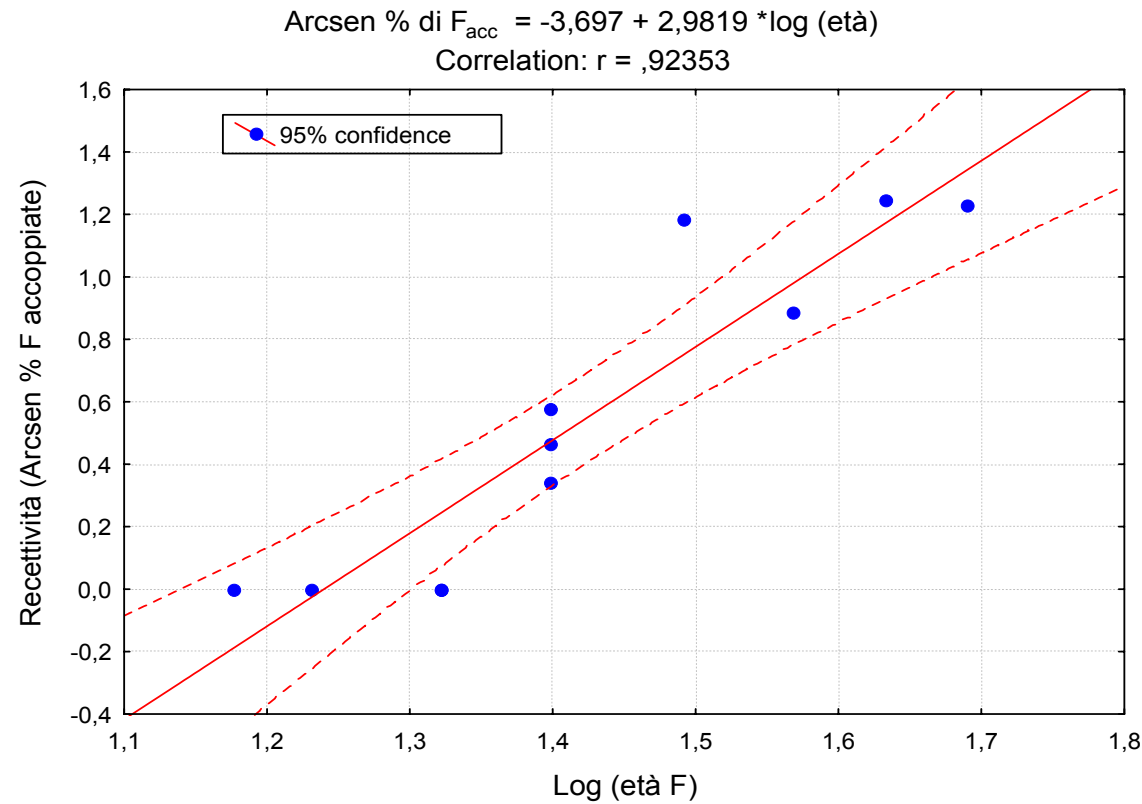
Di seguito si riportano i parametri statistici della regressione (Tab. 3.36) e in figura 3.25 viene rappresentata con i suoi livelli di confidenza 95%.

Tab. 3.36 - Parametri di regressione della retta di recettività femminile in funzione dell'età

Regression Summary: R= 0,92352799 R²= 0,85290395 Adjusted R²= 0,83655994
F(1,9) = 52,185 p < 0,00005 Std.Error of estimate: 0,21114

N =11	Beta	Err.Std.	B	Err.Std.	t(9)	p-level
Intercetta			-3,69714	0,589896	-6,26745	0,000147
log età	0,923528	0,127844	2,98188	0,412781	7,22388	0,000050

Fig. 3.25 - Rapporto tra recettività e età delle femmine (retta di regressione)



3.3.6 - Prove in tunnel 2007 (40 Gy)

In tabella 3.37 sono riportati i dati raccolti nel corso delle prove in tunnel con gli indici di competitività calcolati per i diversi tunnel realizzati.

Tab. 3.37 - Dati prove in tunnel 2007

Competition Rate 1:1:1 - 40Gy (2,3 Gy/min) on PSA 30-40h

Data	Prova	Gy	Ceppo*	Uova deposte	N uova / femmina	Larve	% Schiusura	IC
15/05 - 30/05	T1_2	TEST	A_A	675	10,38	618	99,85%
15/05 - 30/05	T1_4	TEST	A_A	652	11,24	582	91,56%
15/05 - 30/05	T1_1	40	AA_A	1144	22	500	46,77%	1,05
15/05 - 30/05	T1_3	40	AA_A	478	9,19	255	53,56%	0,79
15/05 - 30/05	T1_5	40	AA_A	1223	27,18	1004	83,32%	0,15
A = Rimini allevamento								0,66 ± 0,46
31/5 - 18/06	T2_3	TEST	A_A	2271	66,79	1966	86,57%
31/5 - 18/06	T2_4	40	AI_A	2196	52,29	1303	59,34%	0,46
31/5 - 18/06	T2_5	40	AJ_A	2818	56,36	1246	44,22%	0,96
31/5 - 18/06	T2_1	40	IA_A	2168	58,59	1121	51,71%	0,68
31/5 - 18/06	T2_2	40	JA_A	2697	55,04	1204	44,64%	0,96
I = ♂ Rimini X ♀ Cesena; J = ♂ Cesena X ♀ Rimini; A = Rimini allevamento								0,77 ± 0,24
19/06 - 03/07	T3_2	TEST	A_A	3916	79,92	2573	79,85%
19/06 - 03/07	T3_5	40	AI_A	1258	25,16	370	41,34%	0,94
19/06 - 03/07	T3_4	40	AJ_A	1521	36,21	500	46,68%	0,71
19/06 - 03/07	T3_3	40	IA_A	1980	58,24	894	55,25%	0,45
19/06 - 03/07	T3_1	40	JA_A	2398	64,81	456	46,46%	0,74
I = ♂ Rimini X ♀ Cesena; J = ♂ Cesena X ♀ Rimini; A = Rimini allevamento								0,71 ± 0,20
04/07 - 18/07	T4_1	TEST	A_A	1888	44,95	1581	87,45%
04/07 - 18/07	T4_5	TEST	S_S	2576	45,19	2055	84,12%
04/07 - 18/07	T4_2	40	AA_A	3341	58,61	1592	51,39%	0,71
A = Rimini allevamento; S = Rimini campo								0,71
24/07 - 07/08	T5_4	TEST	S_S	2464	61,6	2356	96,83%
24/07 - 07/08	T5_2	40	IS_S	1580	35,11	887	59,49%	0,63
24/07 - 07/08	T5_1	40	JS_S	1136	37,87	603	54,84%	0,78
24/07 - 07/08	T5_5	40	SI_S	562	14,79	333	59,96%	0,62
24/07 - 07/08	T5_3	40	SJ_S	1218	71,65	584	48,19%	1,03
I = ♂ Rimini X ♀ Cesena; J = ♂ Cesena X ♀ Rimini; S = Rimini campo								0,77 ± 0,19
08/08 - 22/08	T6_4	40	SY_S	1820	30,33	1485	81,59%	0,09
08/08 - 22/08	T6_5	40	SY_S	778	48,63	426	54,76%	0,63
08/08 - 22/08	T6_1	40	YS_S	1248	52	657	56,73%	0,57
08/08 - 22/08	T6_2	40	YS_S	458	45,8	294	64,19%	0,38
Y = Matera X Pinerolo; S = Rimini campo								0,42 ± 0,24

* (Maschi Sterili) (Maschi Fertili)_(Femmine) S = Selvatico; A = Allevamento; X = Y, I = J = ibrido

Le prove in tunnel sono state condotte dal 15/05/2007 al 22/08/2007 in località Anzola Emilia.

Per tutto il periodo di svolgimento delle prove sono stati annotati i valori di temperatura minima e massima, di precipitazione e di umidità relativa media registrati dalle stazioni del Servizio Meteorologico Regionale ARPA per le zona di svolgimento delle prove. L'andamento dei dati ambientali nel periodo di prova è mostrato in figura 3.26 e 3.27.

Fig. 3.26 - Andamento della Temperature minime e massime (Zola Predosa)

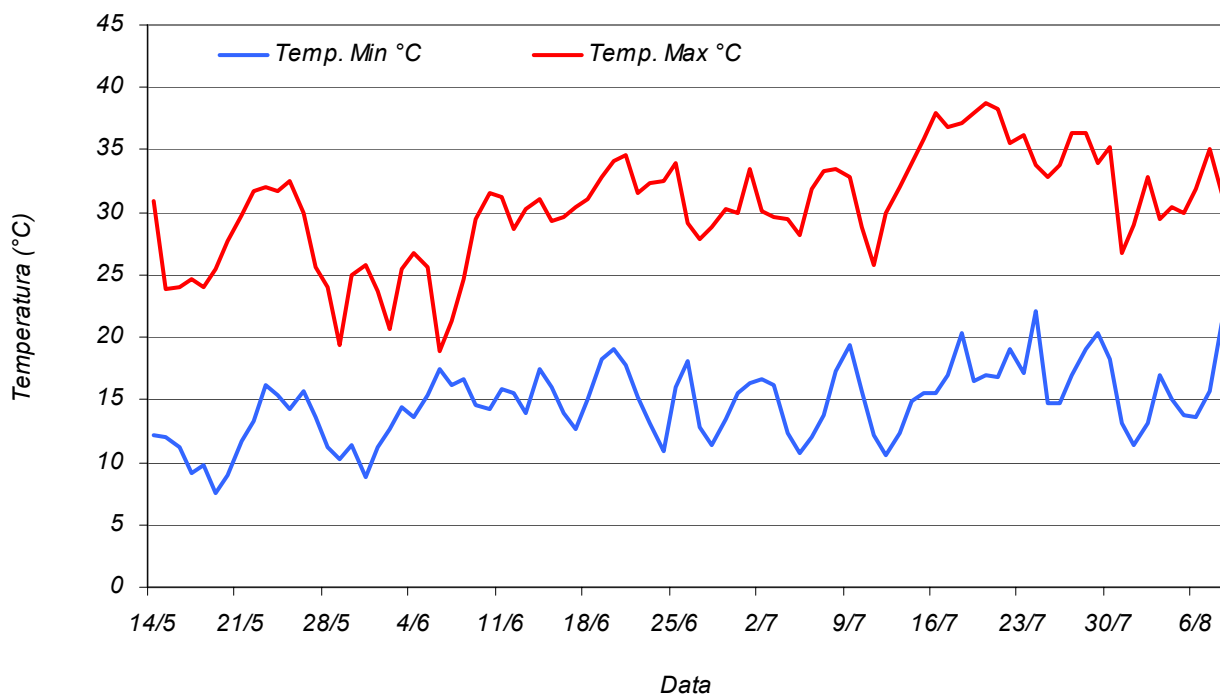
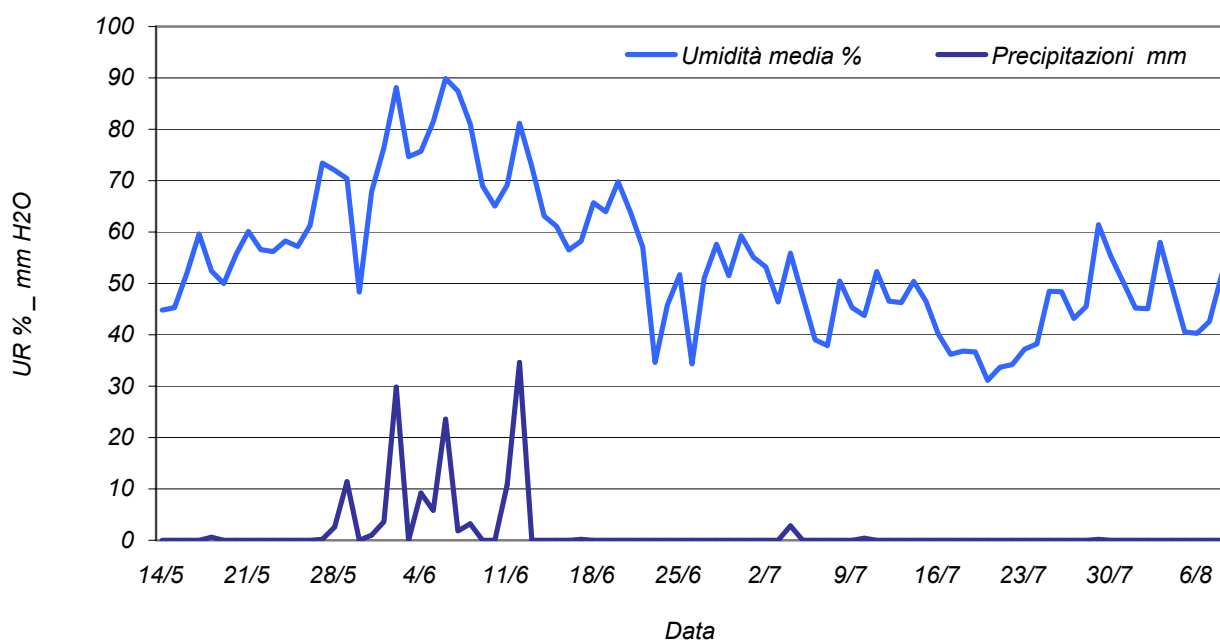


Fig. 3.27 - Andamento dell'UR% media e delle precipitazioni (Zola Predosa)



Confronto tra tunnel testimone (A_A) e tunnel competizione (AA_A)

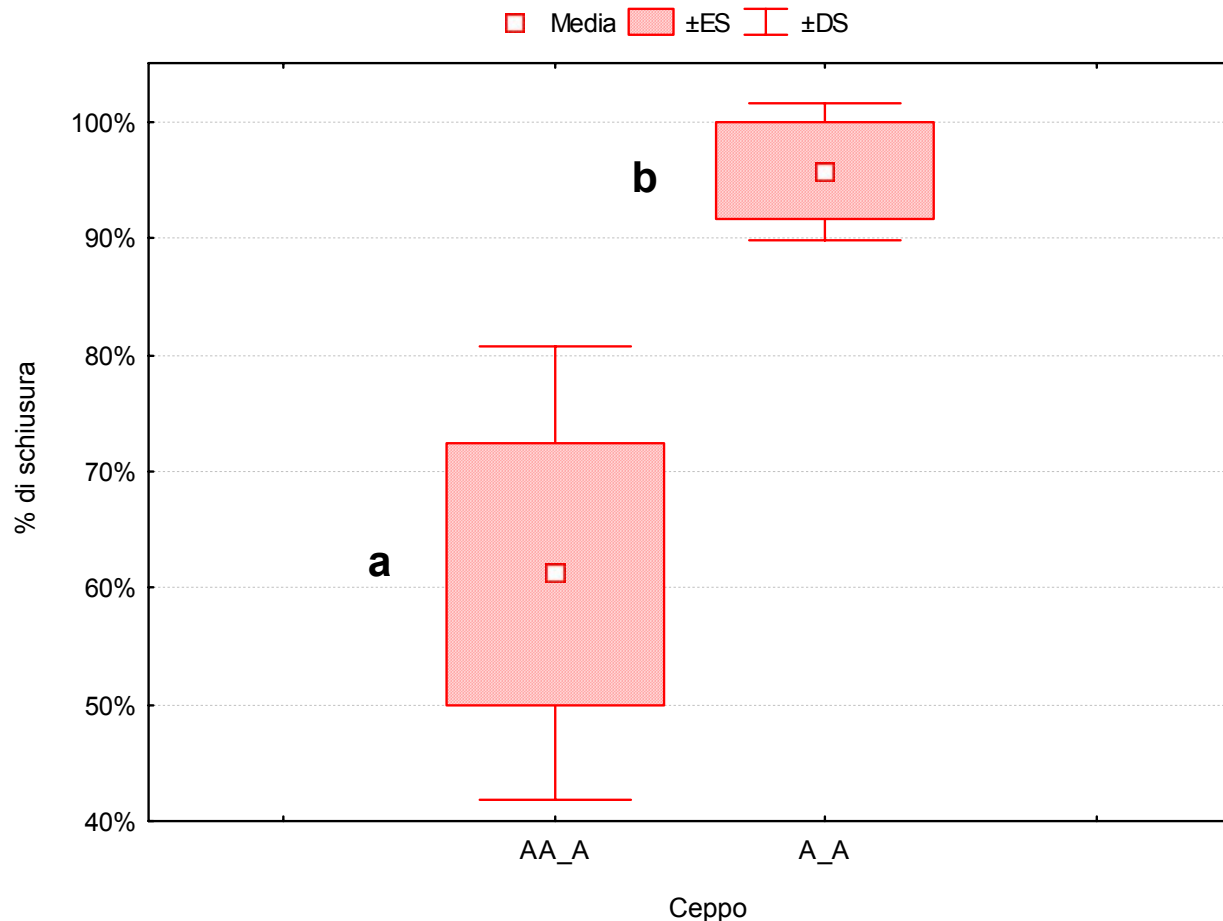
A – Ceppo Allevamento (Rimini)

La percentuale di schiusura media nei tunnel competizione con maschi fertili e sterili di allevamento (**AA_A**) è del 61,2% mentre la percentuale di schiusura nel testimone con solo maschi fertili di allevamento (**A_A**) risulta statisticamente superiore e pari a 95,7% (Fig. 3.28 - Test Newmann-Keuls). Non si evidenziano comunque differenze significative ($F=7,20$ e $p=0,07$) nella percentuale di schiusura per le prove di competizione (**AA_A**) replicate (Tab. 3.38). L'indice di competizione medio calcolato attraverso l'indice di Fried è pari a 0,66 (Tab. 3.38). In Fig. 3.28 si può osservare il rapporto tra le percentuali di schiusura tra tunnel testimone (**A_A**) e tunnel competizione (**AA_A**).

Tab. 3.38 - Prova 1 - Percentuali di schiusura tunnel testimone vs. tunnel competizione

	N	% di schiusura	IC
AA_A	3	61,21 ± 19,44	0,66 ± 0,27
A_A	2	95,71 ± 05,86	
All grps	5	75,01 ± 23,55	

Fig. 3.28 - Confronto tra le % di schiusura tra tunnel testimone (A_A) e tunnel competizione (AA_A)



Confronto tra tunnel testimone (A_A) e i tunnel competizione Ibrido vs. Allevamento

I – Ceppo Ibrido Allevamento = ♂ Rimini X ♀ Cesena;

J – Ceppo Ibrido Allevamento = ♂ Cesena X ♀ Rimini;

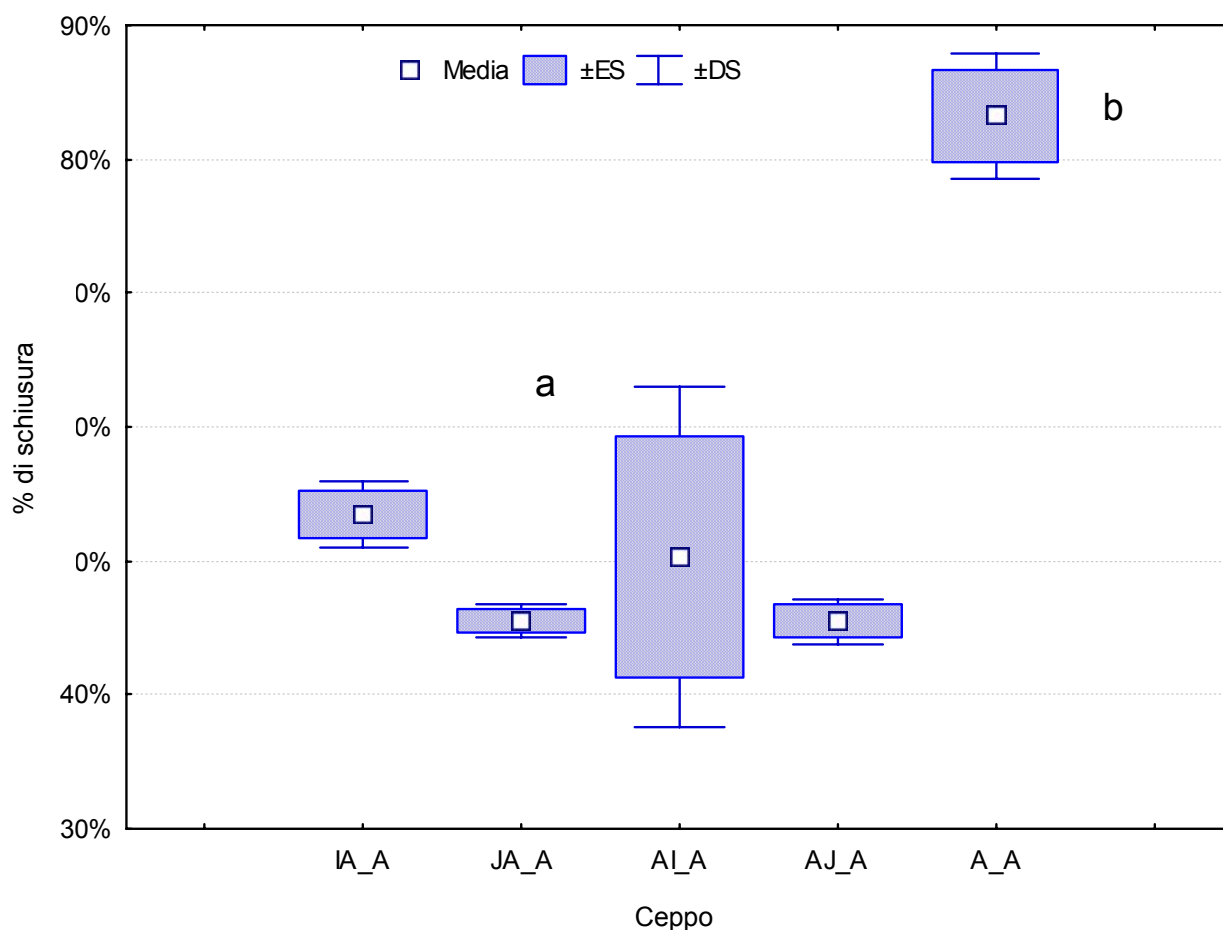
A – Ceppo Allevamento (Rimini)

La percentuale di schiusura media nei tunnel e gli indici di competizione medi calcolati per le diverse combinazioni realizzate sono riportate in Tab. 3.39. Non si evidenziano comunque differenze significative ($F=13,79$ e $p=0,066$) nella percentuale di schiusura tra le diverse combinazioni di ibridi realizzati (Tab.3.39, Fig.3.29 - Test Newmann-Keuls). In Fig.3.29 si può osservare il confronto tra le percentuali di schiusura nel tunnel testimone (A-A) e nei diversi tunnel competizione.

Tab. 3.39 - Percentuali di schiusura tunnel testimone (A-A) vs. tunnel competizione

	N	% di schiusura	IC
IA_A	2	53,48 ± 2,51	0,56 ± 0,16
JA_A	2	45,55 ± 1,28	0,85 ± 0,16
AI_A	2	50,34 ± 12,7	0,70 ± 0,34
AJ_A	2	45,45 ± 1,74	0,83 ± 0,18
A_A	2	83,21 ± 4,75	

Fig. 3.29 - Confronto tra le % di schiusura tra tunnel testimone (A_A) e tunnel competizione ibridi.



Analisi fertilità residua e indici di competizione

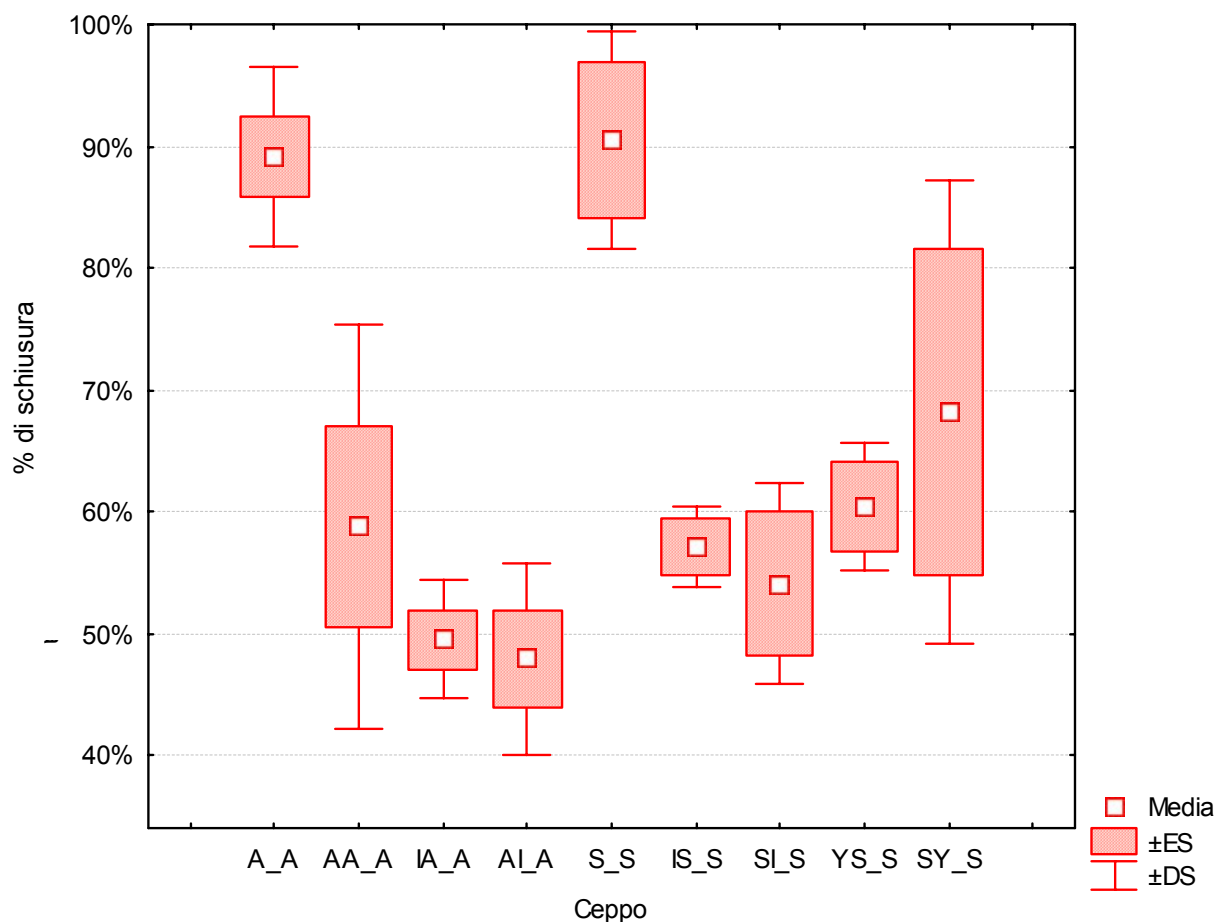
Le analisi condotte su tutte le prove di competizione realizzate sono rappresentate in figura 3.30.

I ceppi ibridi J e I non avendo evidenziato differenze significative tra loro sono stati accorpati nelle analisi finali e identificati come ceppo ibrido I (Tab.3.40). Il ceppo ibridi I è quindi da considerarsi semplicemente come la F1 dell'incrocio tra i ceppi di allevamento Rimini e Cesena indipendentemente dalla provenienza relativa dei maschi e delle femmine utilizzati.

Tab. 3.40 - Indice di competizione prove in tunnel competizione 2007

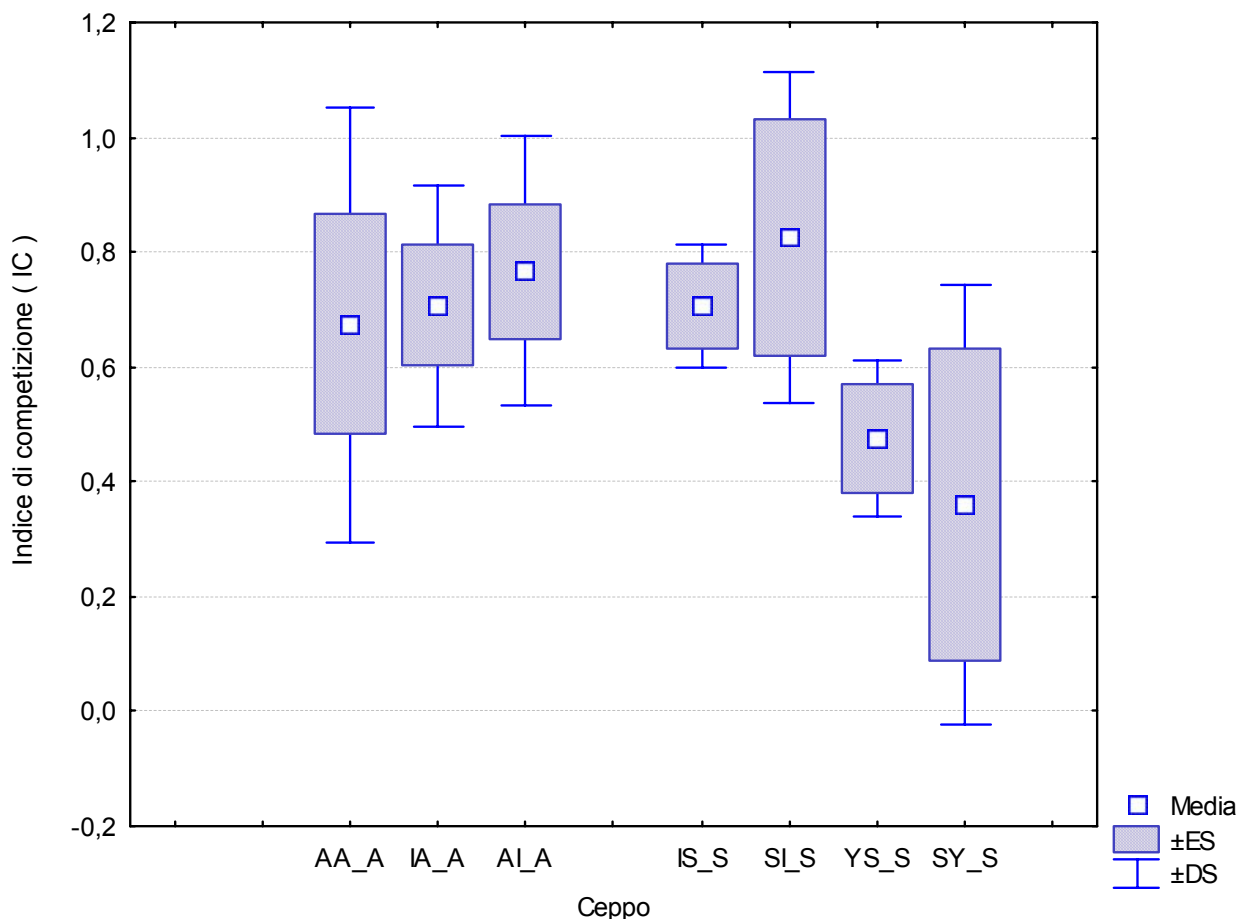
	N	% di schiusura	IC
A_A	4	89,06 ± 7,35
AA_A	4	58,76 ± 16,62	0,68 ± 0,38
IA_A	4	49,52 ± 4,86	0,71 ± 0,21
AI_A	4	47,90 ± 7,94	0,77 ± 0,23
S_S	2	90,48 ± 8,99
IS_S	2	57,17 ± 3,29	0,71 ± 0,11
SI_S	2	54,08 ± 8,32	0,83 ± 0,29
YS_S	2	60,46 ± 5,28	0,48 ± 0,13
SY_S	2	68,18 ± 18,97	0,36 ± 0,38

Fig. 3.30 - Confronto tra le percentuali di schiusura di tutte le prove realizzate.



Si osservano differenze significative ($F=8,351$; $p=0,0001$) nelle percentuali di schiusura tra tunnel testimoni e i tunnel competizione. Non si osservano differenze sulla competizione in funzione dell'impiego dei diversi ceppi ibridi ($F=0,7957$; $p=0,5897$). L'analisi dei livelli di competizione nei maschi sterili in tunnel non evidenzia variazioni significative dovute all'impiego di ceppi selvatici o di allevamento (Tab.3.40; Fig. 3.31)

Fig. 3.31 - Confronto tra gli indici di competizione di tutte le prove realizzate.



Infine in tabella 3.41 si riportano i dati della percentuale di schiusura osservata in laboratorio con l'impiego di soli esemplari sterili per le correzioni necessarie per il calcolo della competitività dei diversi ceppi nei tunnel realizzati

Tab. 3.41 - Percentuali di schiusura in laboratorio dei ceppi impiegati in competizione

Ceppo	Dose	Fertilità residua (% di schiusura)
A = Ceppo Allevamento (Rimini 18)	40 Gy	0,206
I = Ceppo Ibrido Allevamento (♂Rimini 18 X ♀Cesena 18)	40 Gy	0,252
J = Ceppo Ibrido Allevamento (♂Cesena 18 X ♀ Rimini 18)	40 Gy	0,694
I = Ceppo Ibrido Allevamento (Rimini 19 X Cesena 19)	40 Gy	0,473
S = Ceppo Selvatico (Rimini)	40 Gy	0,557
Y = Ceppo Ibrido Allevamento (Matera 5 x Pinerolo 20)	40 Gy	0,555

L'allevamento di adulti di *Aedes albopictus* in gabbia non determina depressione da inbreeding con perdita di variabilità genetica e quindi di fitness in campo. I ceppi selvatici ottenuti dalla schiusura di uova raccolte in campo non mostrano un vantaggio competitivo sui maschi cresciuti in allevamento. Dalle osservazioni condotte sui ceppi ibridi si può inoltre concludere che l'eterosi fornita dal mescolamento di popolazioni di diversa provenienza geografica e/o di diversa tipologia di allevamento non sembra fornire un vantaggio nella competizione per l'accoppiamento in tunnel.

4. CONSIDERAZIONI FINALI

L'attività di ricerca di dottorato svolta ha avuto come scopo la messa a punto delle metodiche di allevamento massale e di sterilizzazione in grado di permettere la produzione di maschi di qualità sufficiente a garantire una buona fitness nelle condizioni di campo e competitività coi maschi selvatici nella fase di accoppiamento.

L'impiego di nuove diete larvali è stato valutato con successo attraverso l'integrazione di lecitina (*Tetramin*®) nella dieta comunemente fornita alle larve. Secondo quanto riportato da Sneller e Dadd (1981) la lecitina integrata nella dieta, migliora la crescita larvale riducendo il tempo di impupamento. Questo additivo, ben tollerato dalle larve a tutte le concentrazioni testate, mostra scarso effetto sul peso delle pupe maschili e femminili, aumenta la longevità degli adulti e migliora la produttività di uova. Ulteriori prove sono comunque necessarie per valutare gli effetti della somministrazione isolata della lecitina sulla produttività e sul vigore delle colonie di *Aedes albopictus* allevate.

L'attuale formulazione della dieta consiste in 2,1 mg/larva *Friskies*® *Adults* cibo per gatti secco + 0,38 mg/larva di lievito di birra + 0,15 mg/larva di *Tetramin*® fornita alle larve il 10% al primo giorno, 20% al secondo, 30% al terzo e 40% al quarto giorno. Le larve vengono allevate in vaschette bianche di plastica (41x31x11 cm) con densità controllata (1333 larve/litro) in 3 litri di acqua dechlorata ossigenata mediante tubi di areazione. Per la separazione dei sessi viene impiegata la tecnica del setacciamento delle pupe in acqua a 35°C attraverso l'impiego di griglie a maglia quadrate di apertura 1.400 µm.

Con l'impiego di pupe allevate con la nuova dieta testata si è ridotta la quota di femmine inquinanti nel setacciato a 1-2%. Ulteriori prove sono necessarie per verificare i dosaggi della dieta al fine di ridurre la quantità di residuo alimentare nelle vasche di allevamento che potrebbe influenzare negativamente il regolare sviluppo larvale.

Con lo scopo di incrementare la produttività di uova prodotte dai ceppi di *Ae. albopictus* in allevamento è stata inoltre valutata la possibile reazione fagostimolante dell'ATP addizionato al pasto di sangue delle femmine adulte. Con l'addizione di ATP nel pasto delle femmine si sono ottenuti incrementi di produttività non significativamente apprezzabili e il suo impiego è da ritenersi per il momento escluso anche in funzione del suo elevato costo.

Ulteriori studi su analoghi chimici dell'ATP (adenylylimidodiphosphate e adenylylmethylenediphosphate) sono suggeriti per valutare l'incremento dell'attività fagostimolante nelle femmine di *Ae. albopictus*. In studi condotti da Galun *et al.* (1985 b) questi composti risultavano infatti da 3 a 5 volte più efficaci dell'ATP nell'incrementare il numero dei pasti compiuti da femmine di *Ae. aegypti*. Inoltre tutti i composti chimici offerti alle femmine in questo studio erano preventivamente dissolti in 0,15M NaCl e 0,01M di NaHCO₃ una soluzione ritenuta ideale per la suzione in femmine di questa specie (Galun *et al.*, 1984).

Le condizioni dell'allevamento sono da tenere in attenta considerazione in termini di parametri ambientali, in particolare fotoperiodo, temperatura e luminosità scalare nelle fasi di alba e crepuscolo, per la possibile influenza che esercitano sul comportamento degli adulti in campo. Sarà buona regola in generale organizzare l'allevamento massale simulando nel migliore dei modi le condizioni ambientali che i maschi troveranno a seguito del lancio cercando di attuare tutte le possibili misure idonee a ridurre al minimo il livello di "artificialità" ineluttabilmente presente in un allevamento.

E' interessante sottolineare che l'influenza negativa del "fattore allevamento" sulla competitività dei maschi sia stata valutata in alcuni casi di peso superiore all'influenza dell'irraggiamento dei maschi (Reisen *et al.*, 1980; Reisen *et al.*, 1982). L'importanza del fattore allevamento sulla competitività dei maschi nella fase di accoppiamento potrebbe essere legata allo specifico comportamento della specie nella scelta dei luoghi e dei tempi di formazione degli sciami di accoppiamento come ipotizzato nel caso di *Cx.tarsalis* da McDonald *et al.* (1979) e da Reisen *et al.* (1982).

Attraverso prove di laboratorio sono stati investigati in gabbia gli effetti sterilizzanti di diverse dosi radianti (20 - 85 Gy) sulle pupe maschio di *Ae. albopictus* per la valutazione della sopravvivenza dei maschi e dei livelli di sterilità e fecondità indotti sulle femmine.

Oltre alla sopravvivenza e alla sterilità, la scelta dello stadio di sviluppo più conveniente da irraggiare in un programma SIT dipende dalla possibilità di maneggiare in sicurezza grandi quantità di insetti senza danneggiarli durante tutte le fasi che intercorrono tra l'allevamento massale, l'irraggiamento e il lancio in campo. La fase pupale risulta sicuramente più vantaggiosa per il maggior numero di pupe irraggiabili per unità di volume e per il minimo danneggiamento arrecabile all'insetto che viene mantenuto in acqua durante tutte le procedure.

La possibilità di lavorare con la minima dose radiante efficace, significa ridurre lo stress provocato inevitabilmente alle pupe maschio, che si manifesta nell'adulto con una ridotta longevità, una diminuita capacità di accoppiamento o di ricerca del partner e attraverso possibili alterazioni comportamentali che possono rendere il maschio inattivo o inefficace una volta introdotto in campo.

La minore dose impiegata per il raggiungimento della sterilità con minimi effetti sulla longevità dei maschi è stata identificata in 40Gy (Cs 137 - 2,3 Gy/min) operando su pupe di età 30-40h.

I risultati ottenuti sottoponendo pupe maschili a irraggiamento a differenti ore dall'impupamento evidenziano infatti come la maturità del campione influisca sia sulla mortalità delle pupe che sull'efficacia sterilizzante dell'irraggiamento. Come riportato anche da Wijeyaratne (1977) le pupe più vecchie mostrano una minore mortalità e una maggiore sensibilità alle radiazioni rispetto a quelle più giovani.

In particolare si è osservato come pupe maschili di età superiore 14h fossero maggiormente sensibili all'irraggiamento riportando minore perdita di competitività rispetto alle pupe irraggiate precocemente.

Le prove condotte in laboratorio sugli effetti dell'irraggiamento sui maschi irraggiati hanno mostrato come i maschi irraggiati a dosi di 40Gy non subiscano importanti alterazioni nell'efficacia di accoppiamento, nei tempi di maturazione e nella percentuale di sopravvivenza rispetto al testimone non irraggiato.

Per trattamenti condotti su pupe di età > 30h la longevità dei maschi non risente dell'irraggiamento fino a dosi di 40Gy. Per dosi di irraggiamento superiori ai 40 Gy, si osserva invece una generale tendenza all'aumento della mortalità in funzione dell'aumento della dose fornita per tutte le età pupali di irraggiamento testate.

La fecondità delle femmine accoppiatesi con maschi irraggiati con dosi superiori a 40Gy mostra una tendenza alla riduzione del numero di uova prodotte con l'aumentare della dose ricevuta dal maschio mentre per dosi comprese tra 20 e 40 Gy non si evidenziano differenze significative.

L'irraggiamento delle pupe non determina variazioni significative nei tempi di sfarfallamento degli adulti per dosi radianti inferiori a 60 Gy in rapporto al testimone non irraggiato. A 60 Gy le radiazioni sembrano invece avere un effetto precocizzante sullo sfarfallamento. Il 50% dei maschi irraggiati con 60Gy sfarfalla

2,94 ore prima rispetto al testimone, mentre il 90% di sfarfallamento dei maschi irraggiati si raggiunge 5,26 ore prima dei maschi fertili.

L'irraggiamento a dosi superiori a 40 Gy sembra influenzare anche i tempi di rotazione dei genitali esterni dei maschi evidenziando un ritardo che appare proporzionale alla dose ricevuta.

Resta da definire sui maschi irraggiati l'effetto combinato dei due effetti sui tempi di sfarfallamento degli adulti anche se appare chiara l'assenza di variazioni significative per la dose di irraggiamento 40Gy scelta come radiazione utile per la sterilizzazione dei maschi da lanciare in campo.

Per quanto riguarda l'analisi dei tempi di accoppiamento dei maschi irraggiati si osserva in generale una minore reattività rispetto ai maschi fertili nei maschi irraggiati a dosi superiori ai 40 Gy. Inoltre fino a 40 Gy di irraggiamento non si osservano differenze significative tra il numero di femmine fecondate da un maschio sterile ($2,25 \pm 0,71$) e da un maschio fertile ($2,44 \pm 0,27$) nel corso delle 4 ore di prova.

Secondo quanto riportato da Jones (1968) un maschio di zanzara è in grado di fecondare 5 - 6 femmine in rapida successione. I maschi possono anche realizzare fino a 30 accoppiamenti in 30 minuti ma i fluidi seminali e lo sperma si esaurisce dopo cinque o sei accoppiamenti. Occorrono circa due giorni per il maschio per riempire nuovamente le vescicole seminali con nuovo sperma e per rigenerare le sostanze prodotte dalle ghiandole accessorie.

Utilizzando raggi X su pupe di *An.albimanus* di età non superiore alle 24 ore Ali e Rozeboom (1972), osservarono inoltre che a tutti i dosaggi impiegati (20-80Gy) i maschi mantenevano la capacità di inseminare le femmine. In questo studio condotto da Zalom (1981) su *Cx.tarsalis* era possibile confermare che le radiazioni utili ad ottenere sterilizzazione dei maschi avevano scarsi effetti negativi sulle loro capacità di accoppiamento in gabbia con femmine selvatiche.

I risultati sulle capacità di accoppiamento ottenuti per *Ae. albopictus* sono in accordo con quanto riportato in bibliografia e confermano per questa specie la dose di 40Gy come la migliore dose utile per ridurre al minimo gli effetti negativi sul comportamento sessuale dei maschi.

Gli studi condotti sui tempi accoppiamento nelle femmine di *Aedes albopictus* evidenziano una buona recettività (>80%) all'accoppiamento solo per femmine di età superiore a 42-48 h. Prima di tale periodo la femmina realizza accoppiamenti con normale appaiamento dei due sessi ma non riceve il trasferimento degli spermatozoi.

L'effetto negativo della colonizzazione in condizioni artificiali e l'irraggiamento sono riconosciuti come i fattori principali che incidono sulla competitività dei maschi sterilizzati nei confronti di quelli fertili.

Per la verifica della variazione di fitness dovuta a inbreeding ed eterosi, prove di competizione in serra (8x5x2,80 m) sono state realizzate impiegando ceppi allevati in laboratorio (cicli di allevamento in gabbia > 5), ceppi selvatici raccolti in campo e ceppi ibridi ottenuti incrociando diversi ceppi di laboratorio.

Prove preliminari di competizione in tunnel svolte nel 2006 su ceppi selvatici e di allevamento avevano mostrato risultati di competitività dei maschi sterili segnati da forte variabilità. In tale sperimentazione erano impiegati maschi irraggiati a 50 e 60Gy in età pupale 16-48h. Dopo aver condotto analisi per la verifica dei tempi di sfarfallamento, di accoppiamento e di rotazione genitale nei maschi sterilizzati, e di recettività nelle femmine, sono state realizzate nuove prove di competizione.

In queste prove maschi di *Ae. albopictus* irraggiati a 40Gy in età pupale di 30-40h sono stati posizionati in campo, in ambiente naturale ombreggiato ed isolato, all'interno di serre (8x5x2,8 m) insieme a maschi adulti fertili e femmine vergini di *Ae. albopictus* con rapporto 1:1:1. Le prove preliminari 2006 erano

condotte nelle medesime condizioni sperimentali del 2007 ad eccezione dei tempi di inserimento delle femmine vergini passati da 1 giorno nel 2006, a 3 giorni nel 2007 dall'immissione dei maschi in tunnel.

I risultati ottenuti mostrano indici di competizioni (indice di Fried) medi accettabili senza evidenziare differenza fra le diverse combinazioni di ceppi impiegati.

L'allevamento massale quindi non sembra deprimere i ceppi allevati e gli ibridi realizzati non mostrano una vigoria superiore né rispetto ai ceppi selvatici né rispetto ai ceppi allevati in laboratorio.

Nelle prove condotte per la verifica dei livelli di competizione in tunnel i diversi ceppi impiegati per l'ottenimento di ibridi erano mantenuti in gabbia con un numero di individui pari a 1000. Questa quantità era riconosciuta sufficiente a mantenere nella colonia in allevamento di *Ae. aegypti* una buona variabilità genetica senza che si manifestassero importanti derive genetiche (Stahler, 1966). È importante quindi valutare l'impiego di ceppi preventivamente ridotti in omozigosi (single-pair, brother-sister mating technique) prima di avviare gli incroci per l'ottenimento dell'ibrido finale.

È stato comunque dimostrato che l'eterosi riduce i tempi di sviluppo migliorando la sincronia dei tempi di impupamento e di sfarfallamento (Craig, 1964). Ulteriori prove dovranno realizzarsi per investigare la possibilità di impiego degli ibridi negli allevamenti massali riconosciuti unanimemente come un importante strumento per l'ottenimento di ceppi vigorosi

Le linee di ricerca che si rendono necessarie per lo sviluppo tecnologico di un programma SIT su larga scala contro *Ae.albopictus* devono affrontare, oltre alla verifica del grado di accoppiamento dei maschi sterili con le femmine selvatiche in tutti i possibili biotipi, la misura della capacità di dispersione dei maschi sterili (e quindi della più conveniente distanza tra le stazioni di lancio) e la durata della loro capacità di accoppiamento. Tutti questi elementi rivestono grande importanza per il successo del programma di rilascio di insetti sterili in campo (Lowe *et al.*, 1974). È in particolare da considerare la necessità di distribuzione omogenea dei maschi sterili nell'area di lancio in modo da evitare che sussistano sacche non interessate o con densità di maschi sterili troppo bassa (Curtis, 1985).

La possibilità di distribuzione omogenea dei maschi sterili è evidentemente fattore che influisce sul rapporto maschi sterili / maschi fertili che risulta necessario raggiungere in campo. Il problema della omogeneità di lancio si presenta particolarmente arduo nell'ambiente urbano dove sono numerosi gli ambiti isolati quali cortili interni, corti, piazze chiuse.

Le possibilità di marcatura dei maschi, finalizzata allo studio delle loro performances di dispersione ed accoppiamento in natura, potrebbero utilmente sfruttare le tecniche messe a punto per altre specie di insetti mediante impiego di additivi nella dieta quali il Cloruro di Rubidio e il Cloruro di Cesio (Nowatzki *et al.*, 2003, Qureshi *et al.*, 2004) oppure marker genetici discriminanti tra il ceppo allevato e la popolazione selvatica (Alphey, 2002).

Sembra invece sgombrato il campo dalle perplessità che permanevano in merito alla presenza di femmine inquinanti i maschi lanciati. Tali femmine risultano sì pungenti ma infeconde per l'intera durata di vita, fattore che va certamente a vantaggio dell'efficacia complessiva del programma SIT (Smittle *et al.*, 1973; Lowe *et al.*, 1973; Lowe *et al.*, 1974) (Akov, 1966). Il recente episodio epidemico di Chikungunya, che ha colpito il nostro Paese, impone comunque ogni sforzo possibile per la massima riduzione di femmine inquinanti pungenti nelle fasi di rilascio degli insetti sterili in campo.

Interessanti per le ricadute positive in termini di capacità di accoppiamento dei maschi sterili sono le recenti evidenze riguardo l'effetto di composti fitoaromatici in grado di stimolare l'emissione feromonale

dei maschi di *Ceratitis capitata* (Shelly *et al.*, 2004); oppure il possibile effetto probiotico dell'addizione alla dieta degli adulti di batteri simbiotici intestinali (Niyazi *et al.*, 2004).

Il comportamento di accoppiamento dei maschi lanciati deve obbligatoriamente conciliare con quello della popolazione target selvatica. A questo proposito è bene iniziare l'allevamento partendo da materiale selvatico raccolto nella zona operativa ed adottare tutte le possibili misure utili a ridurre la deriva genetica o comportamentale nella colonia che secondo diversi autori, può intervenire in tempi molto ristretti (Asman *et al.*, 1980; Milby *et al.*, 1980; Reisen *et al.*, 1981; Reisen *et al.*, 1982).

Per questo può ritenersi preferibile ripartire *ex novo* periodicamente da materiale selvatico invece che immettere materiale selvatico nell'allevamento massale per la incertezza che rimane circa l'entità effettiva dell'accoppiamento e dello scambio genico tra i due pool in gabbia (Whitten e Foster, 1975). L'impiego di colonie prelevate dal dovrà essere accompagnato da tutte le pratiche di sanificazione per evitare di portare in allevamento massale patogeni dannosi. Procedure e agenti sterilizzanti, antibiotici e inibitori utili per allevamenti massali di zanzare sono stati descritti da Greenberg (1969).

In altri Ditteri dal comportamento di corteggiamento assai sviluppato (*Ceratitis capitata*) si è visto che le femmine selvatiche accettano più frequentemente di accoppiarsi con maschi selvatici rispetto a maschi sterili (Lance *et al.*, 2000).

La vasta esperienza condotta su *C. capitata* ha mostrato la fattibilità e convenienza di sviluppare ceppi in cui la separazione dei sessi è ottenibile su base genetica, sfruttando meccanismi di traslocazione legati al cromosoma maschile. Sono a disposizione ceppi *wp* (*white pupae*) in cui la separazione dei sessi è ottenuta sulla base del colore delle pupe utilizzando macchine a lettura ottica, ceppi *tsl* (*temperature sensitive lethal mutation*) in cui le femmine sono uccise nello stadio di zigote esponendo le uova ad elevate temperature (Rendón *et al.*, 2004).

I problemi di stabilità dei ceppi omozigoti per la mutazione voluta, nel corso dell'allevamento massale, sembrano risolvibili adottando opportune misure di filtro e rimozione degli individui ricombinanti indesiderati (Robinson, 2002). Con questi metodi di sessaggio su base genetica è ora possibile ottenere materiale da lanciare in programmi operativi col 99% e oltre di maschi. Questo risulta molto vantaggioso sotto diversi aspetti primo tra tutti l'efficacia relativa del materiale lanciato (Rendón *et al.*, 2004).

Anche per diverse specie di Culicidi sono stati ottenuti ceppi mutanti in cui il gene della resistenza ad un insetticida è stato fissato sul cromosoma Y in modo che diventi possibile precocemente nella fase di allevamento eliminare selettivamente le femmine (Curtis *et al.*, 1976; Seawright *et al.*, 1978; Kaiser *et al.*, 1978). Questo è evidentemente un grosso vantaggio in termini di produttività, costi di produzione e qualità del materiale lanciato rispetto alla separazione meccanica. Ad es. si riduce notevolmente la presenza di femmine inquinanti nel materiale lanciato entro valori stabili dello 0,2-0,3 %. Meno chiaro è invece l'aspetto legato alla perdita di fitness che deriva al ceppo mutante e i modi per ottenerne il recupero.

Recentissimamente si è avuta notizia delle possibilità offerte dalla tecnologia del vicino infrarosso nella discriminazione dei sessi allo stadio di pupa nel caso della mosca tsetse. Se il metodo si dimostrasse applicabile sulle zanzare si supererebbe uno degli ostacoli più gravosi all'applicazione su larga scala del metodo (Peabody, 2005).

Con lo sviluppo delle tecniche di ingegneria genetica si apre l'era della possibilità di ottenere ceppi transgenici dotati delle caratteristiche più opportune e utili nella fase di allevamento, sessaggio,

sterilizzazione e comportamento in campo (Heinrich e Scott, 2000; Alphey, 2002; Handler, 2002; Allen *et al.*, 2004; Gould e Schliekelman, 2004).

E' pure ipotizzabile la selezione e l'allevamento massale di un ceppo privo di diapausa embrionale (ad es. ceppo tropicale) in modo da lanciare maschi in grado di accoppiarsi e ridurre l'entità delle uova diapausanti (Knippling, 1960; Hanson *et al.*, 1993).

Curtis (1976) suggeriva di ottenere maschi sterili mediante incompatibilità citoplasmatica irradiando contemporaneamente le pupe con 50 Gy in modo da rendere le femmine infeconde senza danneggiare troppo i maschi. Scarse informazioni sono reperibili, nel caso dei Culicidi, sull'effetto dilazionato delle radiazioni sulla progenie del materiale irraggiato.

E' infatti da rimarcare a questo proposito che, in alcune specie di lepidotteri (*C.pomonella*), a seguito dell'esposizione dei maschi parentali a dosi che inducevano sterilità incompleta, sono stati messi in evidenza nella generazione F₁: riduzione di fecondità e fertilità, mortalità durante lo sviluppo larvale, sensibili distorsioni della sex ratio a favore dei maschi (Bloem *et al.*, 1999; Bloem *et al.*, 2003). Questi fenomeni potrebbero esercitare un peso determinante sulla capacità d'impatto del programma SIT nei confronti della specie target.

Sempre riguardo le possibilità di ridurre gli effetti negativi delle radiazioni sul comportamento sessuale dei maschi sterili è pure da considerare la possibilità di irraggiare in ambiente anossico (ad es. arricchendo di azoto l'ambiente), cosa che è risultata ridurre significativamente i danni nel caso di *Glossina morsitans* (Curtis e Langley, 1972). E' però da considerare che mentre nella mosca tsetse si irraggiano le pupe in ambiente aereo con le zanzare è necessario operare in acqua, il che potrebbe cambiare radicalmente le cose.

In studi condotti su *Culex quinquefasciatus* (El-Gazzar *et.al*, 1983) l'impiego di azoto durante le procedure di irraggiamento di pupe e adulti non assicurava una migliore sterilità nei maschi e nemmeno un significativo aumento della competitività nei maschi trattati. L'impiego di azoto mostrava soltanto una protezione contro danni somatici a basse dosi radianti. Questo miglioramento era però neutralizzato dalla necessità di incrementare la dose di irraggiamento in ambiente saturo di azoto per raggiungere gli stessi livelli di sterilità ottenuti in aria. Questi risultati erano differenti da quelli ottenuti da Hallinan e Rai (1973) i quali irraggiando pupe e adulti di *Aedes aegypti* a dosi di 7KR ottenevano maschi che erano competitivi se irraggiati in azoto e non competitivi se trattati in aria.

Attenzione va anche dedicata alla ricerca di possibili metodi alternativi nell'induzione della sterilità nei maschi, siano essi derivanti dall'uso di nuovi composti chimici o di altri tipi di radiazioni (ad es. elettroni o neutroni veloci). E' infatti già stato segnalato (Smittle *et al.*, 1971) che i neutroni veloci sono molto efficaci nell'indurre sterilità nei maschi di *Cx.p.quinquefasciatus* irraggiati allo stadio di pupa giovane. Non sono state reperite informazioni sufficientemente approfondite a questo riguardo.

Sotto il profilo dell'analisi dei costi economici è utile considerare che il costo di produzione dei maschi sterili può subire forti contrazioni a seguito dell'introduzione di nuove conoscenze e/o tecnologie.

L'interesse per la metodica è certamente tornato nella moda scientifica dopo anni di abbandono. Si assiste dunque ad un vivace incremento delle iniziative a sostegno dell'approccio non ultima la creazione dell'International Database on Insect Disinfestation and Sterilization (IDIDAS) un archivio on line contenente oltre 2.750 referenze rilevanti per la metodica SIT, sotto l'egida FAO/IAEA Division, Section of Insect Pest Control (Bakri *et al.*, 2005) (IDIDAS: <http://www-ididas.iaea.org/ididas>).

BIBLIOGRAFIA

- Abdel-Malek A.A., A.O. Tantawy, A.M. Wakid. 1967. Studies on the eradication of *Anopheles pharoensis* by the sterile-male technique using cobalt-60. III. Determination of the sterile dose and its biological effects on different characters related to "fitness" components. *J. Econ. Entomol.* 60: 20-23
- Ali S.R., L.E. Rozeboom. 1972. Observations on sterilization of *Anopheles (C.) albimanus* Wiedemann by X-irradiation. *Mosq. News* 32: 574-579
- Allen M.L., A.M. Handler, D.R. Berkebile, S.R. Skoda. 2004. PiggyBac transformation of the New World screwworm, *Cochliomyia hominivorax*, produces multiple distinct mutant strains. *Med. Vet. Entomol.* 18: 1-9
- Alphey L.. 2002. Re-engineering the sterile insect technique. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32: 1243-1247
- Anonymous. 1975. Oh, New Delhi; oh, Geneva. *Nature* 256: 355-358
- Asahina S 1964. Food Material And Feeding Procedures For Mosquito Larvae. *Bull. Who* 31(4): 463-64
- Asman K.N.F. , Reisen S.M. (1987). Changes In The Biology Of *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae) Associated With Colonization Under Contrasting Regimes. *Environ. Entomol.* 16(2): 405-14
- Asman S.M., F.G. Zalom, R.P. Meyer. 1980. A field release of irradiated male *Culex tarsalis* in California. *Proc. Calif. Mosq. Vector Control Assoc.* 48: 64
- Asman S.M., P.T. McDonald, T. PROUT. 1981. Field studies of genetic control systems for mosquitoes. *Ann. Rev. Entomol.* 26: 289-318
- Bailey D.L., D.A. Dame, W.L. Munroe, J.A. Thomas (1978): Colony maintenance of *Anopheles albimanus* Wiedemann by feeding preserved blood through natural membrane. *Mosq. News* 38: 403-408
- Bailey D.L., R.E. Lowe, J.E.F. Fowler, D.A. Dame. 1979. Sterilizing and packaging males of *Anopheles albimanus* Wiedemann for field release. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 28: 902-908
- Baker R.H., W.K. Reisen, R.K. Sakai, C.G. Hayes, M. Aslamkhan, U.T. Saifuddin, F. Mahmood, A. Perveen, S. Javed. 1979. Field assessment of mating competitiveness of males *Culex tritaeniorhynchus* carrying a complex chromosomal aberration. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 72: 751-758
- Bakri A., N. Heather, J. Hendrichs, I. Ferris. 2005. Fifty years of radiation biology in entomology: lessons learned from IDIDAS. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 98: 1-12
- Barry J.D., T. Blessinger, J.G. Morse. 2004. Recapture of sterile Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae) in California's preventative release program. *J. Econ. Entomol.* 97: 1554-1562
- Bartlett, A. C. 1990. Insect sterility, insect genetics, and insect control, pp. 279-287. In D. Pimentel [ed.], *Handbook of Pest Management in Agriculture*, Vol. II. CRC Press, Boca Raton, FL.

- Baumhover A.H., A.J. Graham, B.A. Bitter, D.E. Hopkins, W.D. New, F.H. Dudley, R.C. Bushland. 1955. Screw-worm control through release of sterilized flies. J. Econ. Entomol. 48: 462- 466
- Beach, 1980. Physiological changes governing the onset of sexual receptivity in male mosquito J. Insect Physiol, 26, 245-252
- Bellini R., M. Carrieri, A. Benedetti. 1994. *Aedes albopictus* a Desenzano del Garda: avvio di un programma di eradicazione. Disinfestazione, 11(2): 19-23
- Bellini R., M. Carrieri, A. Benedetti. 1995. Primo anno di attività del programma di lotta ad *Aedes albopictus* a Desenzano del Garda. Disinfestazione, 12(2): 29-34.
- Bellini R., M. Carrieri, M. Bacchi, A. Benedetti. 1996. Secondo anno di attività del programma di lotta ad *Aedes albopictus* a Desenzano del Garda, Sirmione e Lonato. Disinfestazione, 13(1): 55-61
- Bellini R., M. Carrieri, M. Bacchi, A. Benedetti. 1997. Terzo anno di attività del programma di lotta ad *Aedes albopictus* a Desenzano del Garda, Sirmione e Lonato. Disinfestazione 14(3): 51-56
- Bloem S., J.E. Carpenter, J.H. Hofmeyr. 2003. Radiation biology and inherited sterility in False Codling moth (Lepidoptera: Tortricidae). J. Econ. Entomol. 96: 1724-1731
- Bloem S., K.A. Bloem, J.E. Carpenter, C.O. Calkins. 1999. Inherited sterility in codling moth (Lepidoptera: Tortricidae): effect of substerilizing doses of radiation on insect fecundity, fertility and control. Ann. Entomol. Soc. Am. 92: 222-229
- Bushland R.C., D.E. Hopkins. 1953. Sterilization of screwworm flies with X-rays and gamma rays. J. Econ. Entomol. 48: 648-656
- Celli G., R. Bellini, M. Carrieri. 1994. Survey on *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) infestation in Desenzano del Garda (Brescia province-Italy). Boll. Ist. Ent. "G. Grandi" Univ. Bologna, 48: 211-217
- Celli G.. 1968. I chemiosterilizzanti nella lotta contro gli insetti nocivi. Inf. Fitopat. 18(11): 223-230
- Clements 1999. The biology of mosquito, vol.2; CABI Publishing Ch. 35.3 pg 363-364
- Cole M.M., G.C. Labrecque, G.S. Burden. 1959. Effects of gamma radiation on some insects affecting man. J. Econ. Entomol. 52: 448-450
- Coppel, H. C. e J. W. Merlins (1977). Biological insect pest suppression. Springer-Verlag, New York.
- Craig G B Jr (1964). Applications of Genetic Technology to Mosquito Rearing. Bull. WHO 31(4): 469-73
- Curtis C.F. 1976. Testing systems for the genetic control of mosquitoes. XV Int. Cong. Entomol. Washington, 106-116
- Curtis C.F. 1985. Genetic control of insect pests: growth industry or lead balloon? Biol. J. Linnean Soc. 26: 359-374

- Curtis C.F., J. Akiyama, G. Davidson. 1976. A genetic sexing system in *Anopheles gambiae* species A. Mosq. News 36: 492-498
- Curtis C.F., P.A. Langley. 1972. Use of nitrogen and chilling in the production of radiation induced sterility in the tsetse fly *Glossina morsitans*. Entomol. Exp. Appl. 15: 360-372
- Curtis C.F.. 1985. Genetic control of insect pests: growth industry or lead balloon? Biol. J. Linnean Soc. 26: 359-374
- Dame D.A., C.S. Lofgren, H.R. Ford, M.D. Boston, K.F. Baldwin, G.M. Jeffery. 1974. Release of chemosterilized males for the control of *Anopheles albimanus* in El Salvador. II. Methods of rearing, sterilization, and distribution. Am. J. Trop. Med. Hyg. 23: 282-287
- Dame D.A., D.B. Woodard, H.R. Ford, D.E. Weidhaas. 1964. Field behavior of sexually sterile *Anopheles quadrimaculatus* males. Mosq. News 24: 6-14
- Darrow D.I. 1968. The effect of gamma irradiation on reproduction and life span of the mosquito *Culex tarsalis* Coquillett. Mosq. News 28: 21-24
- Davis A.N., J.B. Gahan, D.E. Weidhaas, C.N. Smith. 1959. Exploratory studies on gamma radiation for the sterilization and control of *Anopheles quadrimaculatus*. J. Econ. Entomol. 52: 868-870
- El-Gazzar L. M., Dame D. A., E Smittle B. J. (1983). Fertility and Competitiveness of *Culex quinquefasciatus* Males Irradiated in Nitrogen. J. Econ. Entomol. 76: 821-823
- Flath R.A., R.T. Cunningham, T.R. Mon, J.O. John. 1994. Male lures for Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata* Wied.: structural analogues of -copaene. J. Chem. Ecol. 20: 2595-2609
- Fried, M. (1971). Determination of sterile-insect competitiveness. J. Econ. Entomol. 64: 869-72.
- Friend, W.G. (1978) Physical factors affecting the feeding responses of *Culiseta inordinata* ATP, and blood. Annals of the Entomological Society of America 7, 935-940.
- Galun R. , Koontz L. C. e Gwadz R. W. (1985 a) Engorgement response of anopheline mosquitoes to blood fractions and artificial solutions. Physiological Entomology 10,145-149
- Galun R. , Koontz L.C. , Gwadz R.W. e Ribeiro J.M.C. (1985 b) Effect of ATP analogues on the gorging response of *Aedes aegypti*. Physiological Entomology 10, 275-281
- Galun, R. e Rice, J.J. (1971) Role of platelets in haematophagy. Nature, 223, 110-111.
- Galun, R., Oren, N.e Zecharia. M. (1984). Effect of plasma components on the feeding response of the mosquito *Aedes aegypti* to adenine nucleotides. Physiological Entomology, 9, 403-408.
- Gould F., P. Schliekelman. 2004. Population genetics of autocidal control and strain replacement. Ann. Rev. Entomol. 49: 193-217

Greenberg B. (1969) Sterilizing Procedures and Agents, Antibiotics and Inhibitors in Mass Rearing of Insects Conference on Disease and Large-Scale Rearing of Insects. Annual meeting of the Entomological Society of America, Chicago

Grover K.K., S.G. Suguna, D.K. Uppal, K.R.P. Singh, M.A. Ansari, C.F. Curtis, D. Singh, V.P. Sharma, K.N. Panicker. 1976. Field experiments on the competitiveness of males carrying genetic control systems for *Aedes aegypti*. Ent. Exp. Appl. 20: 8-18

Gwadz R.W. , Craig G.B.Jr. (1968). Sexual receptivity in female *Aedes Aegypti*. Mosquito News: 28 (4): 586 - 593

Hallinan, E., e K. S. Rai. (1973). Radiation sterilization of *Aedes aegypti* in nitrogen and implications for sterile male technique. Nature (London) 244: 368-369.

Handler A.M.. 2002. Prospects for using genetic transformation for improved SIT and new biocontrol methods. Genetica 116: 137-149

Hanson S.M., J.-P. Mutebi, G.B. Craig Jr., R.J. Novak. 1993. Reducing the overwintering ability of *Aedes albopictus* by male release. J. Am. Mosq. Control Ass. 9: 78-83

Heinrich J.C., M.J. Scott. 2000. A repressible female-specific lethal genetic system for making transgenic insect strains suitable for a sterile-release program. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 8229-8232

Hendrichs J., G. Franz, P. Rendon. 1995. Increased effectiveness and applicability of the sterile insect technique through male-only releases for control of Mediterranean fruit flies during fruiting season. J. Appl. Entomol. 119: 371-377

Honorio N.A., W. Da Costa Silva, P.J. Leite, J.M. Goncalves, L.P. Lounibos, R. Lourenco-De-Oliveira. 2003. Dispersal of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicida) in an urban endemic dengue area in the state of Rio de Janeiro, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 98: 191-198.

Hooper G.H.S., K.P. Katiyar. 1971. Competitiveness of Gamma-sterilized males of the Mediterranean fruit fly. J. Econ. Entomol. 64: 1068-1071

Hosoi, T. (1959) Identification of blood components which induce gorging of the mosquito. Journal of Insect Physiology, 3, 191-218.

Jayaraman K.S.. 1997. Consortium aims to revive sterile-mosquito project. Nature 389: 6

Jones J. C, 1968. The Sexual Life Of A Mosquito. Scientific American 218(4): 108-16

Kaiser P.E., D.L. Bailey, R.E. Lowe, J.A. Seawright, D.A. Dame. 1979. Mating competitiveness of chemosterilized males of a genetic sexing strain of *Anopheles albimanus* in laboratory and field tests. Mosq. News 39: 768-775

Kaiser P.E., J.A. Seawright, D.A. Dame, D.J. Joslyn. 1978. Development of a genetic sexing system for *Anopheles albimanus*. J. Econ. Entomol. 71: 766-771

Kardatzke, J. T. e K.-K. Liem. 1972. Growth of *Aedes sfimulans* and *Aedes vexans* (Diptera: Culicidae) in saline solutions. *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 65:1425-1436.

Knipling E.F.. 1955. Possibilities of insect control or eradication through the use of sexually sterile males. *J. Econ. Entomol.* 48: 459-462

Knipling E.F.. 1960. Use of insects for their own destruction. *J. Econ. Entomol.* 53: 415-420

Knipling, E. F. 1979. The Basic Principles of Insect Population Suppression and Management. U. S. Dept. of Agriculture. Agriculture Handbook No. 512. Washington, D. C.

Knipling, E. F. 1985. Sterile insect technique as a screwworm control measure: The concept and its development, pp. 4-7. In O. H. Graham [ed.], Symposium on Eradication of the Screwworm from the United States and Mexico. Misc. Publ. Entomol. Soc. America 62, College Park, MD.

Knipling E.F. 1998. Sterile insect and parasite augmentation techniques: unexploited solutions for many insect pest problems. *Fl. Entomol.* 81: 134-159

Koyama J., H. Kakinohana, T. Miyatake. 2004. Eradication of the melon fly, *Bactrocera cucurbitae*, in Japan: importance of behavior, ecology, genetics, and evolution. *Ann. Rev. Entomol.* 49: 331-349

Labrecque G.C.. 1961. Studies with three alkylating agents as house fly sterilants. *J.Econ. Entomol.* 54: 684-689

Lachance L.E., E.F. Knipling. 1962. Control of insect populations through genetic manipulations. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 55: 515-520

Lance D.R., D.O. Mcinnis, P.Rendon, C.G. Jackson. 2000. Courtship among sterile and wild *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) in field cages in Hawaii and Guatemala. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 93: 1179-1185

Liew C., C.F. Curtis. 2004. Horizontal and vertical dispersal of dengue vector mosquitoes, *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*, in Singapore. *Med. Vet. Entomol.* 18: 351-360

Lofgren C.S., D.A. Dame, S.G. Breeland, D.E. Weidhaas, G. Jeffery, R. Kaiser, H.R. Ford, M.D. Boston, K.F. Baldwin. 1974. Release of chemosterilized males for the control of *Anopheles albimanus* in El Salvador. III. Field methods and population control. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 23: 288-297

Lofgren C.S., M.D. Boston, A.B. Borkovec. 1973. Aziridinylphosphine oxides and sulfides as chemosterilants in male pupae of *Anopheles albimanus* Wiedemann. *Mosq. News* 33: 187-189

Lorimer N., L.P. Lounibos, J.L. Petersen. 1976. Field trials with a translocation homozygote in *Aedes aegypti* for population replacement. *J. Econ. Entomol.* 69: 405-409

Lowe R.E., C.E. Schreck, J.H. Hobbs, D.A. Dame, C.S. Lofgren. 1975. Studies on flight range and survival of *Anopheles albimanus* Wiedemann in El Salvador. II. Comparisons of release methods with sterile and normal adults in wet and dry seasons. *Mosq. News* 35: 160-168

- Lowe R.E., D.L. Bailey, D.A. Dame, K.E. Savage., P.E. Kaiser. 1980. Efficiency of techniques for the mass release of sterile male *Anopheles albimanus* Wiedemann in El Salvador. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29: 695-703
- Lowe R.E., H.R. Ford, A.L. Cameron, B.J. Smittle, D.A. Dame, R.S. Patterson, D.E. Weidhaas. 1974. Competitiveness of sterile male *Culex pipiens quinquefasciatus* Say released into a natural population. *Mosq. News* 34: 447-453
- Lowe R.E., H.R. Ford, B.J. Smittle, D.E. Weidhaas. 1973. Reproductive behavior of *Culex pipiens quinquefasciatus* released into a natural population. *Mosq News* 33: 221-227
- McDonald P. T. (1979). Effects of Laboratory Colonization on the Reproductive Abilities of a Field-Collected *Culex Tarsalis* Population. *Proc. Pap. 47th Annu. Conf. Calif. Mosq. Vect. Control Assoc.*: 60-61
- Mcdonald P.T., M. HANLEY, M. WRENSCH. 1979. Comparison of reproductive characteristics of laboratory and field-collected *Culex tarsalis* in laboratory cages. *Mosq. News* 39: 258-262
- Medici A., Carrieri M., Scholte E-J, Bellini R. (2000): Studies aimed to set-up a sterilization technique program against *Aedes albopictus* Skuse. 13th Ann. Meet. Soc. Vector Ecol., Europ. Reg.. Belek, Turkey, Sept. 24-29
- Milby M.M., R.L. Nelson, P.T. Mcdonald. 1980. Realase of heterozygous translocated adult males for genetic control of *Culex tarsalis* at an isolated site. *Mosq. News* 40: 83-90
- Mousseau T. A. (2000) Intra- and interpopulational genetic variation, pp. 219-250. In T. A. Mousseau, B. Sinervo, and J. Endler (eds.), *Adaptive genetic variation in the wild*. Oxford University Press, New York.
- Mulla M.S.. 1964. Chemosterilization of the mosquito *Culex p. quinquefasciatus*. *Mosq. News* 24: 212-217
- Niyazi N., C.R. Lauzon, T.E. Shelly. 2004. Effect of probiotic adult diets on fitness components of sterile male Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae) under laboratory and field cage conditions. *J. Econ. Entomol.* 97: 1570-1580
- Nowatzki T.M., B. Niimi, K.J. Warren, S. Putnam, L.J. Meinke, D.C. Gosselin, F.E. Harvey, T.E. Hunt, B.D. Siegfried. 2003. In-field labeling of western corn rootworm adults (Coleoptera: Chrysomelidae) with rubidium. *J. Econ. Entomol.* 96: 1750-1759
- O'brien R.D., L.S. Wolfe. 1964.. Academic Press, 211 pp.
- Pal. R., L.E. Lachance. 1974. The operational feasibility of genetic methods for control of insects of medical and veterinary importance. *Ann. Rev. Entomol.* 19: 269-291
- Pappas, L. G. 1973. Larval rearing technique for *Culiseta inornata* (Will.) *Mosq. News* 33: 604-605.
- Patterson R.S., D.E. Weidhaas, H.R. Ford, C.S. Lofgren. 1970. Suppression and elimination of an island population of *Culex pipiens quinquefasciatus* with sterile males. *Science* 168: 1368-1370

Patterson R.S., M.D. Boston, H.R. Ford, C.S. Lofgren. 1971. Techniques for sterilizing large numbers of mosquitoes. Mosq. News 31: 85-90

Patterson R.S., V.P. Sharma, K.R.P. Singh, G.C. La Brecque, P.L. Seetheram, K.K. Grover. 1975. Use of radiosterilized males to control indigenous populations of *Culex pipiens quinquefasciatus* Say: laboratory and field studies. Mosq. News 35: 1-7

Peabody E.K.. 2005. From granaries to insectaries: NIR technology helps human health.<http://www.ars.usda.gov/is/AR/archive/mar05>

Quereshi J.A., L.L. Buschman, S.B. Ramaswamy, J.E. Throne, P.M. Whaley. 2004. Evaluation of rubidium chloride and cesium chloride incorporated in meridic diet to mark *Diatraea grandiosella* (Lepidoptera: Crambidae) for dispersal studies. Environ. Entomol. 33: 487-498

Rai K.S.. 1997. Getting rid of mosquitoes. Nature 390: 113

Rajagopalan P.K., C.F. Curtis, G.D. Brooks, P.K.B. Menon. 1977. The density dependence of larval mortality of *Culex pipiens fatigans* in an urban situation and prediction of its effects on genetic control operations. Indian J. Med. Res. 65(suppl.): 77-85

Reisen W.K., Milby M.M., Asman S.M., Bock M.E., Meyer R.P., McDonald P.T., Reeves W.C., (1982): Attempted suppression of a semi-isolated *Culex tarsalis* population by the release of irradiated males: a second experiment using males from a recently colonized strain. Mosq. News 42: 565-575

Reisen W.K., N.F. Knop, J.J. Peloquin. 1985. Swarming and mating behavior of laboratory and field strains of *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 78: 667-673

Reisen W.K., R.K. Sakai, R.H. Baker, H.R. Rathor, K. Raana, K. Azra, S. Niaz. 1980. Field competitiveness of *Culex tritaeniorhynchus* males carrying a complex chromosomal aberration: a second experiment. Ann. Entomol. Soc. Am. 73: 479-484

Reisen W.K., S.M. Asman, M.M. Milby, M.E. Bock, P.E. Stoddard, R.P. Meyer, W.C. Reeves 1981. Attempted suppression of a semi-isolated population of *Culex tarsalis* by release of irradiated males. Mosq. News 41: 736-744

Reisen W.K., Sakai R.K., Baker R.H., Rathor H.R., Raana K., Azra K., Niaz S., (1980): Field competitiveness of *Culex tritaeniorhynchus* males carrying a complex chromosomal aberration: a second experiment. J. Econ. Entomol. 97:1547-1553

Rendon P., D. Mcinnis, D. Lance, J. Stewart. 2004. Medfly (Diptera: Tephritidae) genetic sexing: large-scale field comparison of males-only and bisexual sterile fly releases in Guatemala. J. Econ. Entomol. 97: 1547-1553

Richardson R.L., J.R. Ellison, W.W. Averoff. 1982. Autocidal control of Screwworms in North America. Science 215: 361-365

Robinson A.S.. 2002. Genetic sexing strains in medfly, *Ceratitis capitata*, sterile insect technique programmes. Genetica 116: 5-13

Rutledge, L.C, Ward, R.A. & Gould, D.J. (1964) Studies the feeding response of mosquitoes to nutritive solutions in a new membrane feeder. *Mosquito News*. 24, 407-419.

Sabatini A., V. Raineri, G. Trovato, M. Coluzzi. 1990. *Aedes albopictus* in Italia e possibile diffusione della specie nell'area mediterranea. *Parassitologia* 32: 301-304

Sacca' G., E. Stella, M.L. Mastrilli, D. Gandolfo. 1969. Sul sinergismo tra hempa e tepa, usati per la chemosterilizzazione di *Musca domestica* L. *Parassitologia* 11: 271-275

Sacca' G., E. Stella. 1964. Una prova di campo per il controllo di *Musca domestica* L. mediante esche liquide a base del chemosterilante tepa (afoxide). *Riv. Parassitologia* 25: 279-294

Sacca' G., M.L. Mastrilli, E. Pierdominici. 1975. Studies on the effectiveness of N,N-tetramethylenebis(1-aziridinecarboxamide), as a chemosterilant for *Musca domestica* L. *Ist. Sup. Sanità*, 655-661

Sacca' G., M.L. Mastrilli, E. Stella, A. Scirocchi. 1972. Sul recupero della fertilità in maschi di *Musca domestica* e *Culex pipiens* sterilizzati con TMAC. *Parassitologia* 14: 373-379

Sacca' G., P.L. Magaudo, D. Guarniera. 1967. Un esperimento di lotta integrata (chimica e biologica) contro *Musca domestica* L., alle isole Lipari. *Riv. Parassitologia* 28: 295-307

Sacca' G., R. Magrone, A. Scirocchi. 1965. Sulla repellenza esercitata da alcuni chemosterilanti verso *Musca domestica* L. *Riv. Parassitologia* 26: 61-66

Seawright J.A., P.E. Kaiser, D.A. Dame, C.S. Lofgren. 1978. Genetic method for the preferential elimination of females of *Anopheles albimanus*. *Science* 200: 1303-1304

Sharma V.P., R.S. Patterson, H.R. Ford. 1972. A device for the rapid separation of male and female mosquito pupae. *Bull. WHO* 47: 429-432

Shelly T.E., D.O. Mcinnis, E. Pahio, J. Edu. 2004. Aromatherapy in the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae): sterile males exposed to ginger root oil in pre-release storage boxes display increased mating competitiveness in field-cage trials. *J. Econ. Entomol.* 97: 846-853

Shelly T.E., P. Rendon, E. Hernandez, S. Salgado, D. Mcinnis, E. Villalobos, P. Liedo. 2003. Effects of diet, ginger root oil, and elevation on the mating competitiveness of male mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae) from a mass-reared, genetic sexing strain in Guatemala. *J. Econ. Entomol.* 96: 1132-1141

Smith C.N., G.C. Labrecque, A.B. Borkovec. 1964. Insect chemosterilants. *Ann. Rev. Entomol.* 9: 269-284

Smittle B.J., G.C. Labrecque, R.S. Patterson. 1971b. Comparison of fast neutrons and gamma rays in producing sterility in *Culex pipiens quinquefasciatus* Say. *Mosq. News* 31: 477-478

Smittle B.J., P.A. Cannarozzi, H.L. Cromroy. 1970. X and gamma rays compared as sterilants for male *Culex pipiens quinquefasciatus* Say. *Mosq. News* 30: 657-659

Smittle B.J., P.A. Cannarozzi, J.B. Gahan. 1971a. Gamma irradiation of eggs, larvae, pupae, and adults of *Culex pipiens quinquefasciatus* Say. Mosq. News 31: 102-105

Smittle B.J., R.E. Lowe, H.R. Ford, D.E. Weidhaas. 1973. Techniques for ³²P labelling and assay of egg rafts from field-collected *Culex pipiens quinquefasciatus* Say. Mosq. News 33: 215-220

Sneller e Dadd (1981) Lecithin in synthetic larval diet for *Aedes aegypti* improves larval and adult performance. Ent. exp. & appl. 29, 9-18. Ned. Entomol. Ver. Amsterdam

Stahler N. et al (1966). Reproductive and Immunological Characteristics of a Strain Of *Aedes Aegypti* Selected for Resistance to Gamma Radiation. Ann. Ent. Soc. Amer. 59(4): 763-765

Strickberger M.V.. 1971. Induced genetic changes. In "Genetics", The MacMillan Comp Ed., pag 536-562

Terwedow H.A.Jr., S.M. Asman, P.T. McDonald, R.L. Nelson, W.C. Reeves. 1977. Mating competitiveness of *Culex tarsalis* double translocation heterozygote males in laboratory and field cage trials. Ann. Entomol. Soc. Am. 70: 849-854

Timmermann S.E., Briegel H., (1999): Larval growth and biosynthesis of reserves in mosquitoes. J. Insect Physiol. 45: 461-470

Trembley H L, 1944. Mosquito Culture Technique. Mosq. News 4(4): 103-19

Urbanelli S., Bellini R., Carrieri M., Sallicandro P., Celli G. 2000. Population structure of *Aedes albopictus* (Skuse): the mosquito which is colonizing Mediterranean countries. Heredity 84. 331-337.

USDA ARS, 1955. Technique of Rearing *Aedes Aegypti* (Yellow-Fever Mosquito). USDA ARS ENTOMOL. RES. BR., Orlando 1 Jan: 2p

Vreysen M.J.B., K.M. Saleh, M.Y. Ali, A.M. Abdulla, Z.-R. Zhu, K.G. Juma, V.A. Dyck, A.R. Msangi, P.A. Mkonyi, H.U. Feldmann. 2000. *Glossina austeni* (Diptera: Glossinidae) eradicated on the island of Unguja, Zanzibar, using the sterile insect technique. J. Econ. Entomol. 93: 123-135

Weidhaas D.E., C.H. Schmidt, E.L. Seabrook. 1962. Field studies on the release of sterile males for the control of *Anopheles quadrimaculatus*. Mosq. News 22: 283-290

Weidhaas D.E., R.S. Patterson, C.S. Lofgren, H.R. Ford. 1971. Bionomics of a population of *Culex pipiens quinquefasciatus* Say. Mosq. News 31: 177-182

White G.B.. 1966. Chemosterilization of *Aedes aegypti* by pupal treatment. Nature 210: 1372-1373

Whitten M.J., G.G. Foster. 1975. Genetical methods of pest control. Ann. Rev. Entomol. 20: 461-476

Wijeyaratne P.M, Weidhaas D.E., Smittle B.J., Boston M.D. 1977. Sterilization of male *Culex quinquefasciatus* evaluation of five insect chemosterilants and gamma irradiation. Mosq. News 37:1-5

Wyss J.H.. 2000. Screwworm eradication in the Americas. Ann. N.Y. Acad. Sc. 916: 186-193

Zalom F.G., S.M. Asman, R.P. Meyer. 1981. Mating competitiveness of irradiated males of *Culex tarsalis* in a field cage study. Mosq. News 41: 230-232